

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



O papel do DNA-PKcs na transcrição mediada pelo promotor LTR do HIV-1

Maria Inês Cardoso Gonçalves

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Paula Matos de Brito
Professora Doutora Maria Filomena Caeiro

2017

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo projeto FCT/VIH/SAU/0020/2011

Aos meus Bisavós

"Always go too far, because that's where you'll find the truth."

Albert Camus

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Doutora Paula Matos de Brito por ter aceitado ser minha orientadora, por tudo o que me ensinou, e por me ter acompanhado na realização deste trabalho laboratorial. Gostaria também de agradecer ao Professor Doutor João Gonçalves por me ter permitido a utilização do seu laboratório. À Professora Doutora Maria Filomena Caeiro, quero agradecer por ter aceitado ser minha orientadora interna e por me ter dado algumas dicas, na parte escrita deste trabalho. Ao Professor Doutor Moniz-Pereira, gostaria também de agradecer por ter permitido a realização deste trabalho na URIA-CPM da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

A todos os meus colegas de laboratório, um grande obrigada pela partilha de conhecimentos, que foi necessária em algumas etapas deste trabalho experimental. Em especial, gostaria de agradecer aos colegas Pedro Perdigão e Catarina Santos, pois sem eles não sei como teria conseguido concluir determinadas experiências.

À Renata Zugaib e ao Miguel Roque, muito obrigada pelas pausas de laboratório e os momentos de comédia que partilhámos, não me vou esquecer!

A todos os meus amigos, muito obrigada pelo apoio e consideração que sempre demonstraram de forma incondicional!

A toda a minha família, obrigada pela motivação que me deu para concluir este trabalho!

O apoio de todas estas pessoas foi muito importante para mim! Um grande obrigada!

ABSTRACT

DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) is a multimeric complex composed by a 450 kDa catalytic subunit (DNA-PKcs), and by a regulatory DNA-binding heterodimer Ku70/80. DNA-PK is a Ser/Thr kinase identified as a crucial regulator of the non-homologous end-joining (NHEJ) DNA-repair. More recently, DNA-PK has also been described to participate in diverse other cellular functions such as telomere maintenance, metabolic gene regulation and transcriptional control, becoming clear that its cellular activity goes far beyond its role in DNA double-strand break repair. DNA-PKcs has been suggested to have a role in HIV-1 life cycle by either helping the virus integration in genomic host DNA or in the HIV-1 Long Terminal Repeat (LTR)-driven transcription. We have previously shown that DNA-PKcs knockdown impairs HIV-1 LTR-driven transcription. However, the underlying mechanisms whereby DNA-PKcs helps HIV-1 transcription are still unclear. In this study, we have examined the capacity of DNA-PKcs to modulate transcriptional activity of the HIV-1 promoter sequence located within the LTR. For this, HeLa P4 and TZM-bl cells with an integrated minimal (-138 to +80) and a full length (-450 to +96) HIV-1 LTR promoter were transfected with several amounts of pCMV6DNA-PKcs (0.25 and 0.5 µg) alone or in the presence of Tat, the LTR transactivator. Our results show that DNA-PKcs only enhanced Tat-full length LTR driven transcription suggesting that HIV-1 promoter sequence not present in a minimal LTR is needed to observe a synergism between DNA-PKcs and Tat on LTR transcription. To confirm these results, 293T cells were co-transfected with several constructs of LTR with different lengths and Tat alone or in the presence of DNA-PKcs (0.25 and 0.5 µg). However, and in contrast with our previous results, we observed that the *cis*-elements presents in a minimal LTR are sufficient for the DNA-PKcs enhancement of Tat LTR-driven transcription. Early reports showed the three Sp1 core promoter binding sites and two NF-κB core enhancer motifs to be key elements involved in the regulation of HIV-1 transcription. Besides that, Tat and DNA-PK may seem to interact to increase the phosphorylation state of the Specificity protein 1 (Sp1), leading to an increase in Tat-full length LTR driven transcription. Therefore, we hypothesized that the three Sp1 binding sites could be the *cis*-elements present in the minimal LTR responsible for DNA-PKcs increase in LTR transcription mediated by Tat. To accomplish that, we have constructed a new LTR with only the three Sp1 core binding sites, through simple cloning experiments. Once constructed the new LTR named LTRSp1, 293T cells were co-transfected with this LTR with different lengths and Tat alone or in the presence of DNA-PKcs (0.25 and 0.5 µg). The results showed a synergism between Tat and DNA-PK, resulting in the enhancement of Tat-LTRSp1 driven transcription. At last, experiments with NU7026, a DNA-PKcs-specific inhibitor, showed that the catalytic subunit is responsible for the increase of Tat-LTR transactivation. In each set of experiments, it was not observed LTR or pCMV transactivation by pCMV6DNA-PKcs itself. Finally, the cellular viability was not affected by the plasmids pCMV-Tat and pCMV6DNA-PKcs.

Overall, this work was important to identify one of the *cis*-elements responsible for the synergism between Tat and DNA-PK, leading to the enhancement of Tat-LTR driven transcription. Discovering the *cis* elements will possibly reveal other transcription factors involved in the DNA-PK enhancement process and new signaling pathways.

Keywords: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1); DNA-dependent protein kinase (DNA-PK); Tat; *cis*-elements; Specificity protein 1(Sp1);

RESUMO

O DNA-PK (Cinase dependente de DNA) é um complexo proteico nuclear que requer uma associação com o DNA para exercer a sua atividade cinásica. Este complexo é constituído por duas componentes: uma subunidade catalítica de 450 kDa (DNA-PKcs) que se trata de uma cinase de serinas e treoninas, e um heterodímero regulador designado por autoantígeno Ku composto por duas subunidades (Ku70/80). Atualmente, sabe-se que DNA-PK participa em vários processos celulares, nomeadamente ao nível do controlo da transcrição, na regulação dos genes do metabolismo celular e na manutenção dos telómeros. No entanto, a sua principal função está relacionada com a reparação de quebras de cadeia dupla no DNA, através do mecanismo NHEJ (*Non-homologous end joining*), que é crucial para a integridade dos linfócitos e para a reparação de quebras de dupla cadeia no DNA. Em consequência, levantou-se a hipótese do envolvimento de DNA-PK no processo de integração do provírus do HIV-1, mas os resultados obtidos geraram controvérsia. Anteriormente, neste laboratório, surgiram evidências de que DNA-PK poderia estar envolvido na transcrição, a partir do LTR do HIV-1 (*HIV-1 Long-Terminal Repeat*): observou-se que o silenciamento de DNA-PKcs, através da aplicação de shRNA, resulta numa diminuição dos níveis de transcrição viral. No entanto, os mecanismos subjacentes à função deste complexo no processo de transcrição ainda estão por esclarecer.

Neste estudo, examinou-se a capacidade do complexo DNA-PK modular a atividade transcrricional, a partir do promotor localizado ao nível do LTR viral. Para isso, transfetaram-se células HeLa-P4 e TZM-bl com várias quantidades do plasmídeo pCMV6DNA-PKcs (0,25 e 0,5 µg) apenas ou na presença de pCMV-Tat, que expressa Tat, o transativador do LTR. Os resultados destas experiências demonstraram que DNA-PK não tem a capacidade de transativar, por si só, o LTR do HIV-1 e o promotor pCMV, existente nos plasmídeos pCMV-Tat e pCMV6DNA-PKcs. Para além disto, observou-se um aumento dos níveis de transativação, a partir do LTR viral, na presença de pCMV-Tat e pCMV6DNA-PKcs, apenas nas células TZM-bl que têm um LTR do HIV-1 integrado completo (nt -454 a +181). As células HeLa-P4 também têm um LTR integrado mas de tamanho pequeno (nt -138 a +80), o que indica que podem existir elementos *cis* em falta neste LTR, necessários para a sinergia observada entre a proteína Tat e o complexo DNA-PK, no processo de transcrição, a partir do LTR do HIV-1. Para confirmar estes resultados, foram produzidos três LTR de diferentes tamanhos e posteriormente, células 293T foram transfetadas com cada um dos LTR em separado e duas quantidades de pCMV6DNA-PKcs (0,25 e 0,5 µg), apenas ou na presença de pCMV-Tat. Contrariamente aos resultados obtidos previamente, verificou-se que afinal o LTR pequeno (nt -138 a +80), presente nas células HeLa-P4, tem os elementos *cis* suficientes para o aumento da transativação do LTR viral, mediada por Tat, na presença de DNA-PK.

Estudos recentes demonstraram que três locais de ligação para o fator de transcrição Sp1 (Proteína de Especificidade 1) no promotor, e dois locais de ligação para NF-κB, na região *enhancer*, parecem ser os elementos chave envolvidos na regulação da transcrição viral, a partir do LTR do HIV-1. Para além disto, Tat e DNA-PK parecem interagir, aumentando o estado de fosforilação de Sp1, que resulta no aumento da expressão do LTR viral. Colocou-se então a hipótese dos locais de ligação para Sp1 corresponderem aos elementos *cis* responsáveis pelo aumento da transativação do LTR pela Tat, na presença de DNA-PKcs. Deste modo, construiu-se um novo LTR apenas com os três locais de ligação para o fator de transcrição Sp1, presentes na região nuclear do promotor viral, através de experiências de clonagem simples. Uma vez construído o novo LTR, ao qual se atribui a designação de LTRSp1, transfetaram-se células 293T com este LTR e duas quantidades de pCMV6DNA-PKcs (0,25 e 0,5 µg) apenas ou na presença de Tat. Os resultados destas experiências demonstraram que houve atividade sinérgica entre Tat e DNA-PK, que leva ao aumento da transativação do novo LTR viral. Por último,

experiências recorrendo ao inibidor NU7026, específico para a atividade catalítica de DNA-PK, permitiram concluir que é a subunidade catalítica deste complexo (DNA-PKcs) que está envolvida no aumento dos níveis de transativação viral. Em qualquer conjunto de experiências efetuadas, no decorrer deste estudo, não se observou transativação do LTR do HIV-1 e do promotor pCMV, existente nos plasmídeos pCMV-Tat e pCMV6DNA-PKcs, apenas na presença do complexo DNA-PK. Finalmente, a viabilidade celular não foi afetada pelos plasmídeos pCMV-Tat e pCMV6DNA-PKcs.

No geral, este trabalho permitiu identificar alguns dos elementos *cis* necessários para a sinergia observada na transativação do LTR do HIV-1, na presença de Tat e DNA-PK, o que facilitará a descoberta com maior precisão de outros fatores de transcrição envolvidos no processo e novas vias de sinalização subjacentes.

Palavras-chave: Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1); Cinase dependente de DNA (DNA-PK); Transativador do LTR do HIV-1 (Tat); Elementos *cis*; Proteína de Especificidade 1 (Sp1);

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	IV
ABSTRACT	V
RESUMO	VI
ÍNDICE	VIII
LISTA DE QUADROS E FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
 1. INTRODUÇÃO	 1
1.1 A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....	1
1.2 O Vírus da Imunodeficiência Adquirida	2
1.2.1 A Estrutura e Genoma	2
1.2.2 O Ciclo de Replicação	3
1.2.3 O processo de transcrição do HIV-1 mediado pelo LTR 5'	5
1.3 A importância dos elementos <i>cis</i> na regulação da transcrição do HIV-1	5
1.3.1 Sp1 e NF-κB: uma chave para a regulação da transcrição viral.....	6
1.4 O complexo DNA-PK	7
1.4.1 A participação do complexo DNA-PK na transativação do LTR do HIV-1	7
 2. OBJETIVOS.....	 9
 3. MATERIAIS E MÉTODOS	 10
3.1 Estirpes Bacterianas	10
3.2 Plasmídeos e construções	10
3.3 Produção e extração de DNA Plasmídico	11
3.4 Cultura de células	11
3.5 Transfecção de células	11
3.6 Ensaio enzimático de CPRG	12
3.7 Ensaio Enzimático da Luciferase	12
3.8 Ensaio de Viabilidade Celular pelo Teste do MTT	13
3.9 Ensaio com o inibidor Nu7026.....	13
3.10 Análise Estatística	14
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 15
4.1 DNA-PKcs é um interveniente no processo de transativação do LTR do HIV-1, mediada por Tat	15
4.2 O LTR mínimo tem os elementos <i>cis</i> necessários para a ação de DNA-PKcs como possível cofator de Tat, na transativação do LTR do HIV-1	16
4.3 Os locais de ligação para Sp1 são um dos elementos <i>cis</i> necessários para a ação de DNA-PKcs, na transativação normal do LTR do HIV-1	19
4.4 DNA-PKcs regula a transcrição do LTR do HIV-1, através da sua atividade cinásica.....	21
4.5 A viabilidade celular não foi afetada por pCMV-Tat, PCMV6DNA-PKcs e NU7026.....	24
 5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS.....	 25
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 28
 7. ANEXOS.....	 31

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Figura 1.1.	2
Figura 1.2.	3
Figura 1.3.	4
Figura 1.4.	6
Figura 1.5.	7
Figura 3.1	12
Figura 3.2	13
Figura 4.1.	15
Figura 4.2.	17
Figura 4.3.	19
Figura 4.4.	21
Figura 4.5.	22
Figura 4.6.	23
Figura 4.7.	24
Figura 7.1.	31
Figura 7.2	32
Figura 7.3	32
Figura 7.4	33
Figura 7.5	33
Figura 7.6	34
Tabela 7.1	31
Tabela 7.2	31
Tabela 7.3	31

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>β-gal</i>	<i>β-galactosidase</i>
Amp	Ampicilina
ATF/CREB	<i>Activating Transcription Factor/Cyclic AMP Response Element Binding</i>
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i>
CA	Cápside
CCR5	<i>C-C Chemokine receptor type 5</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation antigen 4</i>
CDK9	<i>Cyclin-Dependent Kinase 9</i>
CIB2	<i>Calcium and integrin binding family member 2</i>
CMV	Citomegalovírus
CoA	Coenzima A
COUP	<i>Chicken ovalbumin upstream promoter</i>
CPRG	Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosido
CPSF6	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor 6</i>
CXCR4	<i>C-X-C Chemokine receptor type 4</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
E2F-1E	E2 factor-1E
EDTA	Ácido Etilenediaminetetracético
Env	Invólucro
ER	Retículo Endoplasmático
ERK1/2	<i>Extracellular-signal regulated kinase 1 and 2</i>
Gag	<i>Group-specific antigen</i>
GLS	<i>Gag leader sequence</i>
Gp120	<i>Glycoprotein 120</i>
Gp160	<i>Glycoprotein 160</i>
Gp41	<i>Glycoprotein 41</i>
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HATs	<i>Histone Acetyltransferases</i>
HDACs	<i>Histone deacetylases</i>

HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HeLa-P4	HeLa-CD4-LTR- β -gal
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HIV-2	Vírus da imunodeficiência humana tipo 2
HT2A	<i>Hydroxytryptamine receptor 2A</i>
IκB	Inibidor de NF- κ B
IN	Integrase
LB	<i>Lysogeny Broth medium</i>
LEDGF	<i>Lens epithelium-derived growth factor</i>
LEF-1	<i>Lymphocyte Enhancer Factor</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MA	Matrix
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NC	Nucleocápside
Nef	<i>HIV negative factor</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor NF-κB</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
NRE	<i>Negative regulatory element</i>
NSI	<i>Non-syncytia-inducing strain</i>
NUP153	<i>Nuclear pore complex protein 153</i>
NUP358	<i>Nuclear pore complex protein 358</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial de hidrogénio
PI3Ks	<i>Phosphatidylinositol-3-kinases</i>
PIC	Complexo de pré-integração
PK	<i>Protein kinase</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PKR	<i>Protein Kinase R</i>
Pol	Polimerase
PR	Protease

P-TEFb	<i>Positive Transcription Elongation Factor</i>
Ran GTP	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>
RANBP2	<i>RAN binding protein 2</i>
Rev	<i>Regulator of virion protein</i>
RGD	<i>Arg–Gly–Asp</i>
RNA	<i>Ácido Ribonucleico</i>
RNAPol II	<i>Polimerase de RNA tipo II</i>
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RT	<i>Transcriptase Reversa</i>
RTC	<i>Complexo de Transcrição Reversa</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SD	<i>Standart Deviation</i>
Ser16	<i>Serina 16</i>
Ser62	<i>Serina 62</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
SI	<i>Syncytia-inducing strain</i>
SIDA	<i>Síndrome da Imunodeficiência Adquirida</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
SU	<i>Superfície</i>
SWI/SNF	<i>Switch/sucrose non-fermentable</i>
TAF55	<i>TBP-associated factor 55</i>
TAK	<i>Tat-associated kinase</i>
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TAR	<i>Trans-activation response element</i>
Tat	<i>Transativator de Transcrição</i>
TBP1	<i>Tat-binding protein 1</i>
TFIIH	<i>Transcription Factor II H</i>
Tip60	<i>Histone Acetyltransferase 60</i>
TM	<i>Transmembrana</i>
TNPO3	<i>Transportina 3</i>
TRN-SR2	<i>Transportina-SR2</i>
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
USF	<i>Upstream stimulatory factor</i>
Vif	<i>Viral infectivity factor</i>

Vpr	Proteína Viral R
Vpu	Proteína Viral U

1. INTRODUÇÃO

1.1 A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) foi reconhecida como doença pela primeira vez no verão de 1981¹. Dois anos depois, o vírus HIV foi isolado, mas só em 1984² é que foi identificado como o agente causador desta doença^{3,4}. A SIDA caracteriza-se pelo declínio da capacidade de resposta imunitária celular em humanos, levando ao aparecimento de diversas doenças oportunistas em indivíduos previamente saudáveis³. Desde o início desta pandemia foram registados mais de 70 milhões de casos de infeção com HIV e cerca de 35 milhões de mortes. Atualmente, é uma das principais causas de morte a nível mundial. Em 2015, foram descritos aproximadamente 36,7 milhões de pessoas infetadas com HIV e cerca de 2,1 milhões de novos casos de infeção (UNAIDS, 2016). O HIV pode ser transmitido principalmente, por contato sexual através das mucosas superficiais, por exposição materno-infantil ou por inoculação percutânea⁵. O processo de infeção pelo HIV-1 caracteriza-se por uma diminuição progressiva do cluster de linfócitos T CD4+ em diferenciação, levando a uma diminuição da integridade do sistema imunitário⁶. Em consequência, na fase final da doença os indivíduos infetados com este retrovírus tornam-se altamente suscetíveis ao aparecimento de doenças oportunistas como candidíase oral, tuberculose, criptosporidiose, pneumonia e determinados tipos de cancro (linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi e cancro cervical)^{7,8}.

Até ao presente, foram descobertas duas variantes de HIV: o tipo 1 e o tipo 2, sendo que esta última tem menor virulência e prevalência do que a primeira^{9,10}. O HIV-1 é um retrovírus que tem a capacidade de infetar vários tipos de células do sistema imunitário. Os linfócitos T CD4+ são as principais células-alvo, uma vez que expressam elevados níveis da molécula CD4 na superfície celular, que é crucial para a infeção da célula hospedeira. Existem outras células que também podem ser alvo de infeção como os macrófagos, monócitos, células T natural killer, células B, células dendríticas e células progenitoras hematopoiéticas¹¹. Os astrócitos, pertencentes ao sistema nervoso central (SNC), também podem ser alvo de infeção se o retrovírus ultrapassar a barreira hematoencefálica¹².

Para que haja entrada do vírus na célula hospedeira, é necessário o recetor principal CD4 e mais um de dois coreceptores, o CXCR4 ou o CCR5. Os vírus que precisam do recetor *beta* de quimiocinas CCR5 designam-se M-trópicos, NSI ou R5, ao passo que os que recorrem ao recetor alfa CXCR4 designam-se T-trópicos, SI ou X4^{13,14}. A maioria das infeções são estabelecidas, através do coreceptor CCR-5, uma vez que os indivíduos homozigóticos CCR5-Δ32 têm uma probabilidade muito reduzida de serem infetados pelo vírus, relativamente a indivíduos com outros genótipos. O “efeito fundador” poderá ser uma explicação provável para esta situação. Por conseguinte, os vírus R4 aparecem geralmente nas fases finais, em paralelo com o aumento da patogenicidade e progressão da infeção¹¹.

Desde a descoberta do vírus até ao presente, a terapia mais eficaz e, por isso mais utilizada é a Terapia Anti-Retroviral Altamente Eficaz (HAART), que consiste na administração de drogas anti-retrovirais que inibem proteínas e RNA virais. O desenvolvimento desta terapia permitiu uma redução acentuada da mortalidade dos pacientes infetados com HIV, devido à redução da carga viral e ao aumento do número de linfócitos T CD4⁺¹⁵. De facto, HAART permite reduzir a carga viral até níveis praticamente indetetáveis, no entanto não tem a capacidade de erradicar o vírus. Esta situação acontece porque o HIV-1 tem a capacidade de se integrar no genoma e silenciar o processo de transcrição em algumas células, criando reservatórios celulares que conseguem escapar à ação do sistema imunitário e persistir por longos períodos de tempo no organismo, mesmo após vários anos de terapia HAART¹⁶. Para além disto, o aparecimento de novas estirpes mutantes resistentes também constitui um problema para o sucesso desta terapia. Assim, na ausência de uma vacina eficaz, a investigação tem-se focado no

desenvolvimento de mecanismos para reativar estes reservatórios e na criação de estratégias para otimizar a utilização de drogas anti-retrovirais, que incluem a avaliação do genótipo/fenótipo das estirpes de HIV, o uso de inibidores de protease que permitem o aumento da farmacocinética das drogas, e a programação das interrupções do tratamento^{17,18}.

1.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

Taxonomicamente, o Vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) pertence à família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae e género Lentivirus¹⁹.

1.2.1 A ESTRUTURA E GENOMA

A partícula viral do HIV-1 é composta por duas membranas: interna e externa. A membrana externa ou invólucro viral deriva da membrana da célula hospedeira e é constituída por uma bicamada lipídica, na qual as glicoproteínas de superfície (gp120 ou SU) estão ancoradas, através da interação com glicoproteínas transmembranares (gp41 ou TM)^{20,21}. A membrana interna é constituída por várias proteínas p17 que formam uma matriz (MA) em forma de concha icosaédrica, a envolver e a estabilizar a estrutura da cápside cónica (CA), reforçando a sua associação com a membrana externa²². A cápside cónica é formada por múltiplas cópias da

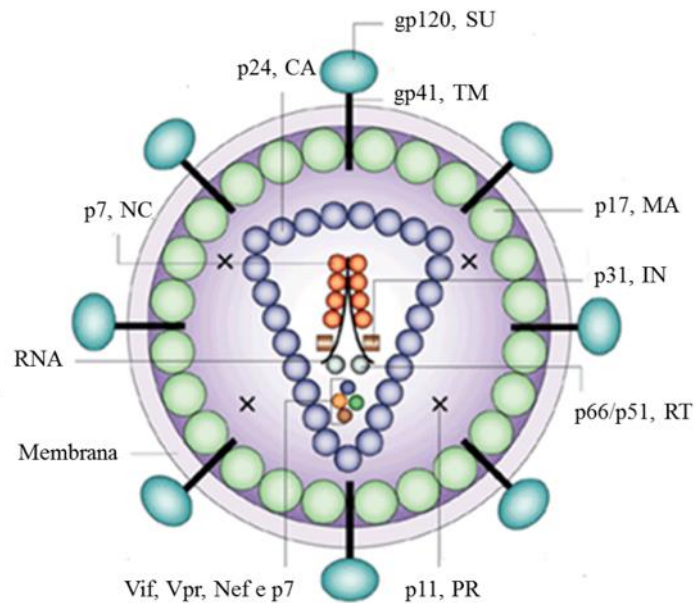


Figura 1.1 Estrutura do HIV-1. Adaptado de *Nature* © 1998, Nature Publishing Group.

proteína p24 e envolve um complexo ribonucleoproteico formado por duas cadeias simples de RNA de aproximadamente 9 Kb, que se encontra estabilizado, através da associação com várias proteínas: proteínas da nucleocápside (p7 ou NC) e enzimas virais como a integrase (p31 ou IN), a transcriptase reversa (p66/p51 ou RT) e a protease (p11 ou PR). No interior da cápside cónica, também existem outras proteínas auxiliares como o fator negativo de regulação (Nef), a proteína viral R (Vpr) e o fator viral de infeção (Vif) (Figura 1.1)^{20,23}.

O genoma do HIV-1 consiste num RNA de aproximadamente 9,7 kilobases (kb). Após o processo de transcrição reversa, o genoma do vírus encontra-se delimitado por duas repetições terminais longas (LTR). O promotor necessário para o início da transcrição viral localiza-se no LTR da extremidade 5'. Entre os dois LTR, existem nove grelhas de leitura, que codificam para três poliproteínas precursoras estruturais (gag, pol e env), duas proteínas com funções regulatórias (rev e tat) e quatro proteínas acessórias (vpu, vif, vpr e nef) (Figura 1.2). A poliproteína gag é precursora de quatro proteínas estruturais, designadamente p24, p6, p7 e p17. O gene pol codifica as principais enzimas virais, nomeadamente a transcriptase reversa (transcreve o RNA viral em DNA de cadeia dupla), a integrase (permite a integração do cDNA viral no genoma da célula hospedeira) e a protease (cliva as proteínas virais, tornando-as funcionais). O gene env codifica a gp160 e constitui o precursor das proteínas gp120 e gp41, presentes no invólucro viral, permitindo que o vírus estabeleça associação e posterior

fusão com a célula hospedeira^{20,24,25}. A proteína Tat funciona como um transativador e por isso, desempenha um papel importante no processo de transcrição, assegurando uma síntese eficiente de mRNAs virais. A proteína Rev é necessária para o transporte, a partir do núcleo para o citoplasma dos diferentes tipos de mRNAs *spliced* e parcialmente *spliced* que codificam para as proteínas do vírus. Em células que não estão completamente ativas, níveis limitantes de Tat e Rev impedem a libertação prematura do vírus²⁶.

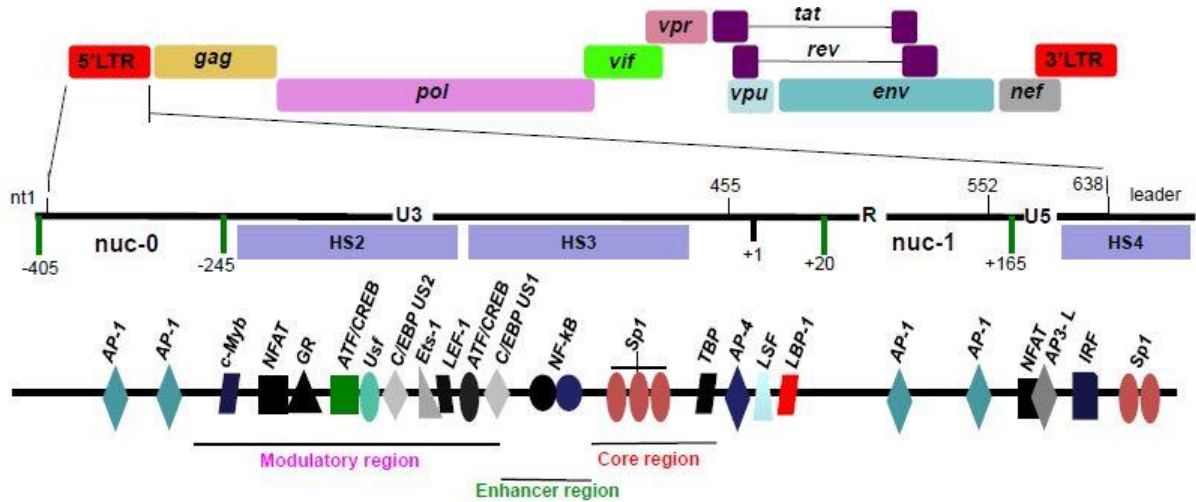


Figura 1.2 Genoma do HIV-1 e os locais de ligação para fatores de transcrição na região 5'LTR. Adaptado de *World J Virology* © 2015, Baishideng Publishing Group.

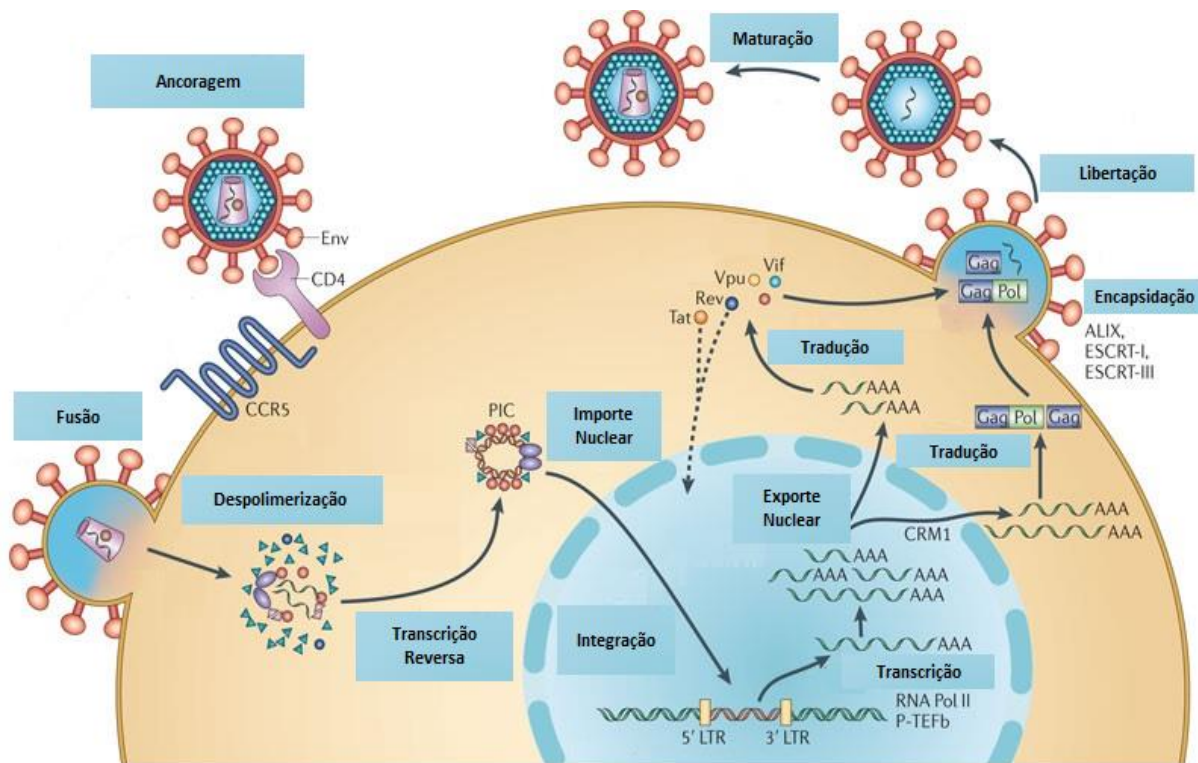
1.2.2 O CICLO DE REPLICAÇÃO

O ciclo de replicação do HIV-1 compreende duas fases: uma fase inicial que começa com o reconhecimento da célula hospedeira pelo vírus até à integração do DNA viral no genoma celular; e uma fase final que tem início com a expressão do DNA viral integrado ou provírus até à maturação e libertação de novos vírus infecciosos. Esta última fase depende da acumulação de quantidades suficientes de Tat obtidas na primeira fase^{20,27} (Figura 1.3).

A primeira fase inicia-se com a interação entre a glicoproteína gp120, localizada ao nível da superfície viral na forma de trímeros gp41/gp120, e o recetor celular CD4. Em consequência, CD4 e gp120 sofrem alterações conformacionais e os coreceptores CXCR4 e CCR5 são recrutados para entrada na célula hospedeira²⁸. A ligação da gp120 a um destes coreceptores desencadeia a dissociação dos trímeros gp120/gp41 e a transição de gp41 para uma conformação fusogénica, na qual o péptido de fusão fica exposto. Esta nova conformação permite a inserção de gp41 na membrana da célula hospedeira, conduzindo à fusão das membranas viral e celular e subsequente libertação da cápside no citoplasma celular²⁹.

No citoplasma celular, tem início um processo de desencapsidação progressivo, durante o qual ocorre um rearranjo do núcleo viral num complexo de transcrição reversa (RTC, *Reverse Transcription Complex*). Este complexo é uma estrutura ampla constituído pelo RNA viral genómico associado a proteínas virais (NC, MA, RT, INT, Vpr) e a proteínas celulares (LEDGF/p75 e BAF) necessárias a etapas subsequentes do ciclo de replicação do HIV-1³⁰. Subsequentemente, ocorre a transcrição reversa que consiste na síntese de cadeias duplas de DNA, a partir de cadeias simples molde de RNA viral genómico pela transcriptase reversa. Este DNA permanece associado a proteínas celulares e virais levando à maturação do RTC e originando o complexo de pré-integração (PIC, *Pre-Integration Complex*).

Para a integração do DNA viral recém-transcrito, no genoma da célula hospedeira, o complexo PIC tem de ser transferido para o núcleo. Este importe ocorre de forma ativa num processo mediado pela Vpr, importinas e RanGTPases. Uma vez no núcleo, o DNA proviral é integrado no DNA genómico celular num processo mediado pela integrase que interage com LEDGF/p75, direcionando-a para os locais de integração do HIV-1. Para além de LEDGF/p75, existem outros fatores envolvidos no direcionamento do cDNA retroviral para os locais de integração nomeadamente, o fator de poliadenilação CPSF6 e as nucleopurinas, NUP153 e NUP358/RANBP2, que estabelecem uma interação com a proteína CA que integra o complexo PIC^{31,32}. O cDNA viral não integrado poderá ser degradado ou circularizar originando os círculos 2LTR. A integração do genoma do HIV-1 no genoma da célula hospedeira conclui a fase inicial do ciclo de vida do HIV-1.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 1.3 Ciclo de Vida do HIV-1. Adaptado de *Nature Reviews Microbiology* © 2012, Nature Publishing Group.

O genoma viral integrado ou provírus pode permanecer latente ou ser ativamente transcrito, iniciando assim a fase final do seu ciclo replicativo. A transcrição do DNA viral é mediada pela polimerase de RNA tipo II (RNAP, RNA polymerase II) do hospedeiro. A proteína Tat é um transativador do LTR capaz de aumentar a transcrição do LTR cerca de 100 vezes acima da transcrição basal. No final de uma transcrição eficaz, são produzidos aproximadamente 30 mRNA virais diferentes por *splicing*, podendo ser divididos em três grupos: os mRNA que são produzidos por *splicing* múltiplo e que codificam para as proteínas Tat, Nef e Rev; os mRNA que são produzidos por *splicing* único e que codificam para as proteínas Vpu, Vpr, Vif e Env; e, por último, os mRNA completos que não sofrem *splicing* e que codificam para as poliproteínas Gag-Gag e Gag-Pol. Todos os mRNA produzidos por *splicing* são constituídos por uma estrutura secundária RRE (*Rev Responsive Element*), localizada na região intrónica da extremidade 3'. Interações específicas entre a proteína regulatória Rev e RRE permitem o transporte núcleo-citosólico³³.

Uma vez no citoplasma, a poliproteína gp160, codificada pelo gene env, é clivada nas glicoproteínas da superfície membranar (gp120) e transmembranar (gp41), durante o seu transporte para a membrana

plasmática da célula hospedeira, que ocorre na via ER-Golgi^{20,23}. As poliproteínas Gag-Gag e Gag-Pol são igualmente transportadas para a membrana plasmática e estabelecem uma ligação com a mesma, através da miristilação do N-terminal da poliproteína Gag. O RNA que vai constituir o genoma viral é subsequentemente encapsidado, através da interação entre um sinal de encapsidação, na extremidade 5', e o domínio NC da poliproteína Gag, sendo no final libertado. Uma vez no exterior da célula, as poliproteínas Gag-Gag e Gag-Pol são clivadas pela protease viral, culminando na maturação do vírus com capacidade de infecção de novas células³⁴.

1.2.3 O PROCESSO DE TRANSCRIÇÃO DO HIV-1 MEDIADO PELO LTR 5'

A transcrição do HIV-1 é um processo complexo frequentemente dividido em duas fases inicial e final, que depende fortemente da maquinaria transcricional da célula.

Após a integração, o LTR da extremidade 5' do provírus funciona como um promotor eucariótico ao passo que o LTR da extremidade 3' atua ao nível da poliadenilação do mRNA nascente e na terminação da transcrição. No entanto, pode haver latência de pós-integração, que pode durar anos, se houver baixa disponibilidade de determinados fatores de transcrição ou integração do DNA viral, em regiões de heterocromatina¹⁶. Casos estas condicionantes não se verifiquem, o processo de transcrição a partir do provírus, é iniciado. Assim, primeiro ocorre a ligação de fatores de transcrição essenciais da célula hospedeira tais como, o NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*), NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) e SP1 (*Specificity Protein 1*) aos seus motivos de reconhecimento presentes no promotor LTR 5'. Estes fatores funcionam como proteínas *enhancer*, transmitindo sinais de ativação para fatores basais, pertencentes à maquinaria geral de transcrição, e promovem a ligação da polimerase de RNA tipo II à sequência consenso TATA, desencadeando o início da transcrição.

Na extremidade 5' do mRNA viral nascente, forma-se uma estrutura em forma de *loop* de 59 nucleótidos, TAR (*Trans-Activating Response Element*). Durante esta fase, a maioria dos transcritos são curtos. Quando ocorre a formação de transcritos completos *multispliced*, estes migram para o citoplasma e conduzem à síntese das proteínas virais regulatórias Tat e Rev. Assim que níveis suficientes da proteína Tat são produzidos, dá-se início à fase final da transativação do LTR do HIV-1³⁴. Tat é uma proteína de 86 aminoácidos, codificada por dois exões e com um peso molecular de 14kDa. O exão 1 codifica para os primeiros 72 aminoácidos, que permitem a atividade de transativação. O exão 2 codifica para 14 aminoácidos que têm um motivo RGD, importante para a ligação de duas integrinas³⁵. Na transativação, o elemento TAR interage com Tat, direcionando-a para montante do promotor no LTR 5', promovendo a interação do transativador com vários fatores de transcrição celulares. Em seguida, Tat recruta o complexo heterodímero P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor*) constituído pela ciclina T e pela cinase CDK9 (*Cyclin-Dependent Kinase 9*) para a fosforilação do domínio C-terminal da RNAPol II, o que desencadeia um aumento drástico dos níveis de transcrição (Figura 1.4)³⁴.

1.3 A IMPORTÂNCIA DOS ELEMENTOS *CIS* NA REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO HIV-1

A expressão genética do HIV-1 é fortemente regulada por elementos *cis*, que são sequências de DNA localizadas no LTR 5' do genoma viral³⁶. A estas sequências ligam-se vários fatores de transcrição virais e celulares, que podem funcionar como ativadores, repressores ou proteínas adaptadoras. Estes fatores interagem entre si, permitindo a regulação da atividade do LTR, em diferentes contextos como por exemplo, em tipos específicos de células, na regulação do ciclo celular, na diferenciação celular ou a nível da ativação celular³⁷.

O LTR do HIV-1 com aproximadamente 640 pb de comprimento é constituído pelas regiões U3, R e U5³⁸. O LTR pode ainda ser dividido em quatro regiões funcionais envolvidas na regulação da transcrição viral: o elemento TAR, na região R (nt +1 a +60); o promotor basal/nuclear (nt -78 a -1);

uma região *enhancer* (nt -105 a -79); e uma região modulatória (nt -454 a -104). As últimas três regiões localizam-se em U3 (Figura 1.2).

O promotor basal tem três locais de ligação ricos em GC para o fator de transcrição Sp1, localizados a 5' da sequência consenso TATA, à qual se liga a proteína TBP (*TATA-binding protein*) e um conjunto de outras proteínas celulares que compreendem o complexo de transcrição da polimerase de RNA tipo II. Imediatamente a montante do promotor, encontra-se o elemento *enhancer*, constituído por dois locais de ligação para o NF- κ B e outros fatores relacionados (Figura 1.4). A montante dos locais de ligação para NF- κ B, localiza-se a região modulatória, que compreende locais de ligação para vários fatores, tais como C/EBP (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*), ATF/CREB (*Activating Transcription Factor/Cyclic AMP Response Element Binding*), LEF-1 (*Lymphocyte Enhancer Factor*), NFAT (*Nuclear Factor of Activated T Cells*) e um quarto local de ligação para Sp1. Tem sido sugerido que os fatores que se ligam à região modulatória regulam a atividade das regiões basal e *enhancer*. Deleções entre os nucleótidos -340 e -184, ao nível da região modulatória, conduziram a um aumento dos níveis de transcrição e replicação do HIV-1, levando à designação desta região por elemento regulatório negativo (NRE, *Negative Regulatory Element*)³⁶. Estudos recentes confirmaram que, de facto, a região NRE é rica em elementos que participam na repressão ou ativação do LTR³⁸. Têm, ainda, sido identificados elementos *cis* importantes na regulação da atividade do promotor viral na região U5 e na sequência GLS (*Gag Leader Sequence*), aos quais se ligam os fatores de transcrição AP-1 e NFAT.

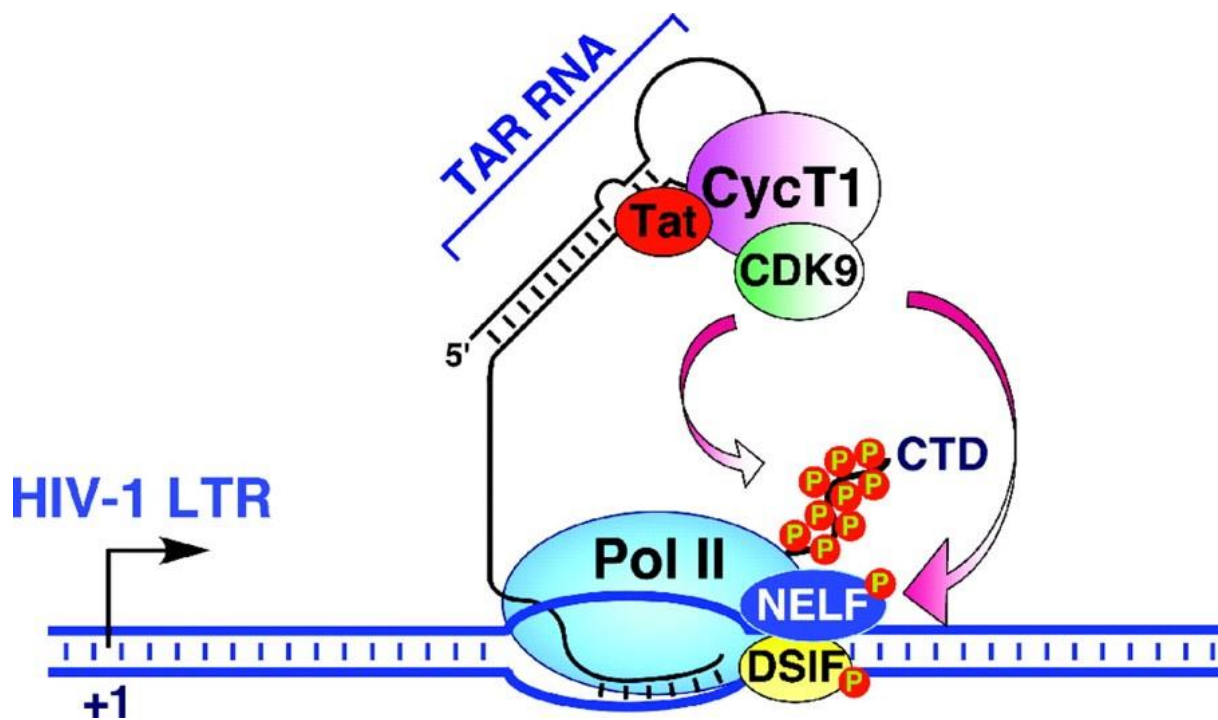


Figura 1.4 Mecanismo de transativação pela proteína viral Tat. Adaptado de *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* © 2006, American Society for Microbiology.

1.3.1 SP1 E NF- κ B: UMA CHAVE PARA A REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO VIRAL

Dos elementos *cis* referidos anteriormente, os três locais de ligação para Sp1, no promotor basal, e os dois locais de ligação para NF- κ B, na região *enhancer* parecem ser elementos chave na regulação da transcrição, a partir do LTR 5' do HIV-1³⁶. A simples ligação de NF- κ B a esses locais é suficiente para garantir uma transcrição viral eficiente. Após ativação da célula hospedeira, a subunidade p65 é liberta do complexo inibitório I κ B, forma um dímero com a subunidade p50 de NF- κ B e transloca-se para o núcleo, onde se liga a locais de ligação para o fator de transcrição NF- κ B³⁷. Como referido

anteriormente, tem sido demonstrado que NF- κ B tem a capacidade de promover, de uma maneira independente de Tat, tanto o início como o prolongamento do processo de transcrição, em níveis semelhantes aos da proteína transativadora. Tat parece estar envolvida na ativação de NF- κ B, através de uma cinase que acelera a degradação de I κ B. Relativamente aos locais de ligação para Sp1, experiências demonstraram que os múltiplos locais de ligação para este fator de transcrição no promotor basal do HIV-1, permitem a sua ativação³⁹, nalguns casos mesmo sem a presença de um elemento *enhancer*⁴⁰. A importância destes locais, na regulação da transcrição do HIV-1 foi ainda demonstrada pela forte inibição da transcrição quando a ligação do fator Sp1 a esses locais foi inibida pela cromomicina *in vitro*⁴¹.

1.4 O COMPLEXO DNA-PK

DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) é um complexo multimérico constituído por uma subunidade catalítica de 470 kDa (DNA-PKcs) e por um componente regulatório, designado por autoantigénio Ku. Ku é um heterodímero constituído por duas subunidades de 70 kDa (Ku70) e de 80 kDa (Ku80) (Figura 1.5). A subunidade Ku70 pode funcionar como ATPase, ou como DNA helicase. DNA-PK estabelece ligação com o DNA, através do fator Ku, que é uma das proteínas celulares humanas mais abundantes, com função de ligação às extremidades do DNA. Ku liga-se maioritariamente a uma grande variedade de estruturas de DNA, ao nível das suas extremidades. Portanto, é crucial que as extremidades estejam livres para que Ku se ligue e por conseguinte, permita a ligação do complexo DNA-PK ao DNA.

DNA-PK é uma cinase nuclear que fosforila resíduos de serinas e treoninas, pertencente à família de cinases PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*). Este complexo tem um papel crucial na reparação e preservação do genoma através da regulação do processo NHEJ, que permite a reparação de quebras de cadeia dupla ao nível do DNA, e a regulação da recombinação V(D)J, necessária para o desenvolvimento dos linfócitos T e B. Além destas funções, DNA-PK tem sido mais recentemente implicado noutras funções celulares nomeadamente, ao nível do controlo da transcrição, manutenção dos telómeros e regulação do metabolismo celular^{42,43}.

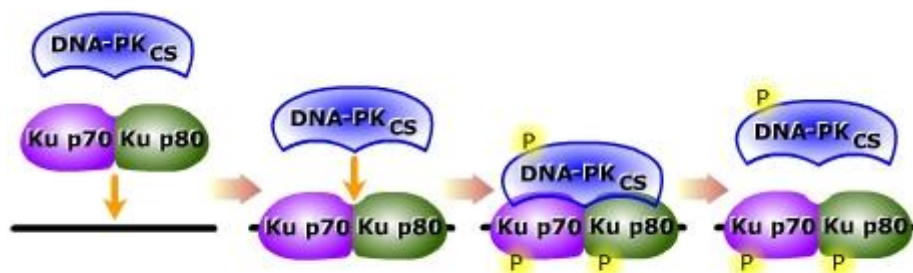


Figura 1.5 Modelo que descreve a ligação do complexo DNA-PK ao DNA e posterior atividade cinásica. Adaptado de <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv6f.html>.

1.4.1 A PARTICIPAÇÃO DO COMPLEXO DNA-PK NA TRANSATIVAÇÃO DO LTR DO HIV-1

Vários estudos têm sugerido a função de DNA-PK como cofator na replicação do HIV-1. No entanto, a forma como DNA-PK exerce essa função é um assunto que tem gerado muita controvérsia. Um estudo em células de ratos SCID, deficientes em DNA-PK, juntamente com outros componentes das vias NHEJ (Ku, XRCC4 e DNA ligase IV), demonstrou que a presença deste complexo seria importante para a integração do DNA retroviral^{44,45}. Mas, outro estudo demonstrou que DNA-PK não é necessário para uma integração eficiente do HIV-1, em conjunto com a via NHEJ⁴⁶. Desta forma,

ainda não foi possível chegar a uma conclusão unânime, relativamente à participação de DNA-PK no processo de integração.

Mais recentemente, tem sido sugerido o envolvimento de DNA-PK, na transcrição mediada pelo LTR do HIV-1. *Chun et al* (1998) demonstraram que a subunidade catalítica (DNA-PKcs) é capaz de estabelecer uma ligação com a proteína Tat, contribuindo para aumentar o estado de fosforilação de Sp1 e consequentemente aumentar a transativação do LTR viral⁴⁷. Ademais, um estudo mais recente realizado em células Jurkat latentes demonstrou que a co-localização do complexo DNA-PK com a polimerase de RNA tipo II é necessária para a reativação do provírus, integrado no genoma de células Jurkat. Nesse mesmo estudo, observou-se que o silenciamento de DNA-PKcs em células Jurkat, infectadas com um vetor lentiviral, provocou uma diminuição dos níveis de transcrição viral. Foi, também, observada uma diminuição dos níveis de p24 nessas células Jurkat, o que sugere que DNA-PK é indispensável pelo menos para a última fase do ciclo de replicação do HIV-1⁴⁸.

No nosso laboratório, o papel de DNA-PKcs no ciclo de vida do HIV-1 foi também avaliado⁴⁹. Para isso, procedeu-se ao silenciamento de DNA-PKcs, através de shRNAs em células Jurkat T que desta forma se tornaram resistentes à replicação do HIV-1. A avaliação do papel desta proteína no ciclo viral indicou que DNA-PKcs não consegue afetar nem a entrada nem a integração do vírus. O silenciamento de DNA-PKcs em células HeLa-P4, que contêm um LTR do HIV-1 integrado, levou a uma inibição da transcrição, a partir do LTR viral, acompanhada por uma diminuição dos níveis da proteína transativadora Tat, sugerindo um papel de DNA-PKcs na transcrição viral e genética.

2. OBJETIVOS

A subunidade catalítica do complexo multimérico DNA-PK (DNA-PKcs) parece estar envolvida na transativação do LTR do HIV-1. No nosso laboratório, o silenciamento de DNA-PKcs em células HeLa P4, que contêm um LTR do HIV-1 integrado, levou a uma inibição da transcrição, a partir do LTR, acompanhada por uma diminuição dos níveis da proteína transativadora Tat, sugerindo um papel desta subunidade catalítica, na transcrição viral e genética⁴⁹. No entanto, os mecanismos moleculares, através dos quais este complexo afeta a transcrição viral ainda estão por esclarecer. Assim, este trabalho tem como objetivo identificar esses mecanismos, através da localização dos elementos *cis* do LTR do HIV-1 necessários para a atividade sinérgica de Tat e DNA-PKcs, na transativação do LTR viral. Posteriormente, a identificação desses elementos permitirá estudar melhor as vias de sinalização relacionadas com a sinergia entre as duas proteínas anteriores, contribuindo para o estudo de novas formas de reativação do genoma viral latente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTIRPES BACTERIANAS

Escherichia coli (*E. coli*) JM109 (New England Biolabs, USA) foi utilizada na propagação dos plasmídeos e na clonagem. Esta estirpe é *recA*-, impedindo a recombinação não desejada do DNA plasmídico com o DNA cromossômico. Na clonagem, utilizaram-se células quimicamente competentes *E. Coli* HST08 ou Stellar Competent Cells (Clontech, Japan) que não têm o cluster de genes (*mrr-hsdRMS-mcrBC* e *mcrA*) responsável pela clivagem de DNA metilado proveniente do exterior, possibilitando a clonagem de DNA caso este esteja metilado. Os genótipos das estirpes bacterianas estão listados em anexo (Tabela 7.1, anexos).

3.2 PLASMÍDEOS E CONSTRUÇÕES

O plasmídeo de expressão da proteína de transativação Tat, pCMV-Tat, foi gentilmente cedido pelos laboratórios de Ham-Rek da Universidade do Estado de Nova Iorque, Buffalo (contribuidor: Dr. Maryanne Simurda) (Figura 7.2, anexos). O plasmídeo de expressão da subunidade catalítica de DNA-PK (DNA-PKcs), pCMV6DNA-PKcs, foi gentilmente cedido pelo Dr K. Meek.

As três construções de LTR, de tamanhos diferentes, foram gentilmente disponibilizadas pelo colega de laboratório Pedro Perdigão⁵⁰. O plasmídeo pGL3 basic da Promega (Wisconsin, USA) com o gene repórter da luciferase foi utilizado como vetor molde, na clonagem para obter as construções. A designação de cada construção depende do tamanho do LTR. Deste modo, o LTR de tamanho mais pequeno (nt -115 a +96) designa-se por LTR mínimo, sendo constituído apenas pela região U3 incompleta, sem a região modulatória (nt -454 a -105), e pela região R (nt +1 a +96) (Figura 7.3, anexos). O LTR mínimo tem tamanho e estrutura semelhante ao LTR pequeno, integrado no genoma das células HeLa P4. Ao LTR de tamanho médio (nt -454 a +96) foi atribuída a designação de LTR intermédio, do qual constam as regiões U3 (nt -454 a +1) e a R, mas não a região U5 (nt +96 a +181) (Figura 7.4, anexos). O LTR de tamanho maior (nt -454 a +181) corresponde ao LTR completo com todas as regiões que definem o LTR do HIV-1: U3, R e U5 (Figura 7.5, anexos). O LTR completo tem tamanho e estrutura semelhante à cópia do LTR, integrada nas células TZM-bl⁵⁰.

A construção do novo LTR, pGL3-LTRSp1, foi obtida a partir da inserção, no vetor molde, de uma *cassette* (nt -78 a +96) com as regiões do promotor basal (nt -78 a +1) e R (nt +1 a +96) incluídas (Figura 7.6, anexos). O plasmídeo com o LTR completo (-454 a +181) integrado foi selecionado como vetor molde. A *cassette* foi amplificada, por PCR, a partir de qualquer um dos plasmídeos dos três LTR de diferentes tamanhos, através de um par de primers específico. O programa de PCR utilizado está presente na tabela 7.3 (Condições de PCR: Programa A, anexos). Os fragmentos com a *cassette*, obtidos por PCR foram purificados do gel, digeridos com as enzimas de restrição *fast digest* MluI e NheI (Thermo Fisher Scientific, USA) e inseridos nos locais de corte de MluI e NheI, presentes no vetor molde selecionado. A T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific, USA) foi utilizada em todas as ligações vetor-inserto. O PCR (Polymerase Chain Reaction) foi efetuado no termociclador Doppio (VWR International, USA), recorrendo a uma DNA polimerase específica (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase) (Finnzymews, Finland), de acordo com as instruções do fabricante. Os primers utilizados nas reações de PCR estão descritos na tabela 7.2 (anexos). Os clones foram avaliados recorrendo às mesmas enzimas de restrição MluI e NheI e diferenciados por eletroforese em gel de agarose (Figura 7.1, anexos). A sequência dos clones positivos foi confirmada por sequenciação *standart* do DNA (Macrogen, Netherland).

3.3 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMÍDICO

Todos os plasmídeos foram transformados e propagados na estirpe de *E. coli* JM109, por eletroporação (V= 1.80 Volt, R= 200 Ω , Cap= 25 μ FD), em cuvettes de 1 mm. As bactérias transformadas cresceram em meio LB (*Lysogeny Broth Medium*) suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina (USB, Cleaveland, USA). Todos os plasmídeos utilizados nas transfeções cresceram a 37 °C com agitação (220 r.p.m), com exceção do plasmídeo pCMV6DNA-PKcs, que foi colocado a crescer a uma temperatura mais baixa de 30 °C e a uma agitação inferior (150 r.p.m), por ser de maiores dimensões e por conseguinte, mais suscetível a mutações no DNA. A extração de DNA plasmídico foi efetuada por miniprep recorrendo ao Kit ZR Plasmid MiniprepTM-Classic (Zymo Research®, USA) ou por midiprep recorrendo ao Kit JETStar 2.0 Plasmid Purification MIDI (Genomed, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante. A extração plasmídica para o *screening* dos clones foi realizada, através de uma preparação miniprep por lise alcalina, de acordo com o protocolo de Maniatis⁵¹.

3.4 CULTURA DE CÉLULAS

As células HeLa-P4 (HeLa-CD4-LTR- β -gal; ARRRP, Division of AIDS, NIAID, NIH, contributor: Dr. Richard Axel) derivam de células do carcinoma epitelial cervical humano e têm o gene da β -galactosidase sob o controlo do promotor LTR do HIV, permitindo a expressão de β -gal, na presença de Tat ou de outro ativador de transcrição, a partir do LTR. As células HEK (*Human Embryonic Kidney*) 293T (ATCC,VA,USA) derivam de células 293, nas quais foi inserido o gene SV40 T-antigen, sensível à temperatura. Estas células têm uma elevada eficiência de transfeção e são competentes para replicar vetores que incluam a região de replicação SV40. As células TZM-bl (ARRRP, Division of AIDS, NIAID, NIH, contributors: Dr. John C. Kappes, Dr. Xiaoyun Wu and Tranzyme Inc), previamente designadas por JC53-bl (clone 13), expressam grandes quantidades de CD4 e CCR5. As células TZM-bl foram geradas a partir das células JC53, através da introdução de várias cópias integradas em separado dos genes da luciferase e da β -galactosidase, sob o controlo do promotor do HIV.

As células HEK293T, TZM-bl e HeLa-P4 foram mantidas em cultura em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de Penicilina, 100 μ g/mL de Estreptomicina e 0,25 μ g/mL de Anfotericina B (DMEM-FBS₁₀). O meio das células HeLa-P4 foi suplementado adicionalmente com G418 (200 μ g/mL) e higromicina (100 μ g/mL). Todas as células foram cultivadas em frascos de cultura T75 (75 cm³) numa incubadora a 37 °C e a 5% de CO₂, numa atmosfera humidificada. Todos os meios de cultura e reagentes, caso contrário indicado, são da Lonza (Basel, Switzerland).

3.5 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS

As células HEK293T, TZM-bl e HeLaP4 foram transfetadas, recorrendo ao reagente de transfeção FuGENE HD (Promega, Wisconsin, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para tentar obter condições ótimas de expressão de DNA-PKcs, a partir de pCMV6DNA-PKcs, as células foram mantidas a baixa densidade. As células foram contadas numa câmara de contagem (Neubauer chamber) após a sua coloração com azul de tripano (Lonza, Switzerland). Aproximadamente, 5x10⁵ células foram semeadas por cada poço de placas de 24 poços (14,5 mm Ø). No dia seguinte, as células foram transfetadas com DNA plasmídico, numa proporção de 1 μ g de DNA:1,5 μ L de FuGENE HD, de acordo com o protocolo do fabricante. O meio foi substituído 24 h após a transfeção e 48h depois, as células foram analisadas.

3.6 ENSAIO ENZIMÁTICO DE CPRG

A detecção da expressão do gene repórter da β -galactosidase presente no LTR, integrado no genoma das células HeLa-P4, foi efetuada por um ensaio colorimétrico de CPRG (Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosido) (Roche, Germany). Uma vez expresso, β -gal catalisa a hidrólise de CPRG, de cor alaranjada, no cromóforo clorofenol de cor vermelha (Figura 3.1). A formação de clorofenol vermelho produz uma solução vermelha escura, que pode ser detetada por leitura da sua absorvância a 550 nm. Dois dias após transfeção das células HeLa-P4, as células foram incubadas com tampão de lise CPRG (PBS pH 7,4, NP-40 1% v/v, MgCl₂ 5 mM) à temperatura ambiente, durante 15 minutos. O substrato CPRG (6 mM em tampão de lise) foi adicionado às amostras e a expressão de β -gal foi medida no aparelho da Tecan Infinite 200 (Tecan, Switzerland).

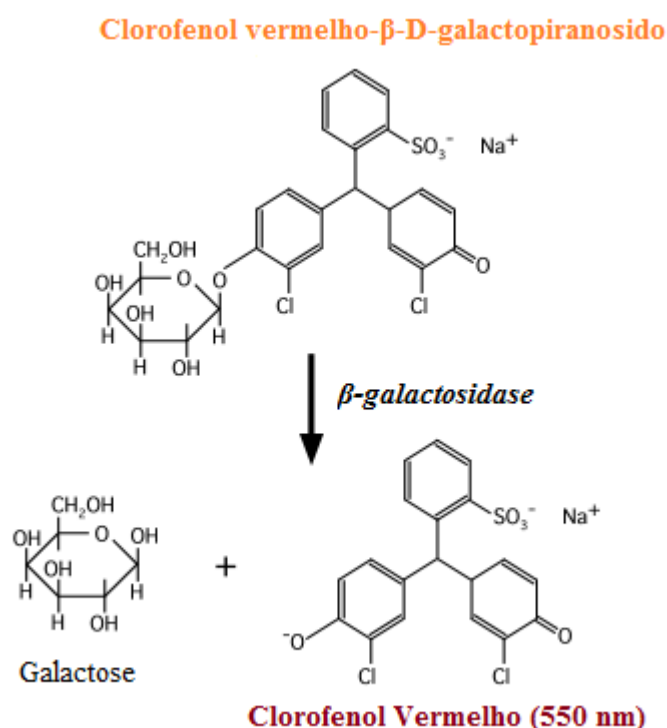


Figura 3.1 Reação de CPRG (Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosido) catalisada pela β -galactosidase.

3.7 ENSAIO ENZIMÁTICO DA LUCIFERASE

A detecção da expressão do gene repórter integrado nos plasmídeos foi efetuada, por quimioluminescência, a partir de um ensaio enzimático da luciferase, que é uma proteína monomérica de 61 kDa, com função enzimática. A enzima luciferase catalisa a reação de oxidação da luciferina em oxiluciferina, através da utilização de ATP•Mg²⁺, como cosubstrato. No decorrer da reação, há emissão de luz, resultante da conversão da energia química, produzida durante a oxidação, através de uma transição eletrónica (Figura 3.2). Este ensaio é muito sensível porque a luz é produzida com o máximo de eficiência quântica, relativamente a outras reações de quimioluminescência⁵². A medição da luciferase foi efetuada no final de cada experiência nos lisados celulares obtidos, após lavagem das células com PBS e ressuspensão em tampão de lise (Tris-acetato 25 mM pH 7,8, DTT 2 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10% v/v e Triton X-100 1% v/v). De seguida, efetuou-se um ciclo de congelamento/aquecimento -80 °C/37 °C. O sobrenadante do lisado foi recolhido e a medição da expressão do gene repórter foi efetuada com o tampão de ensaio de luciferase (Tris-acetato 20 mM pH

7,8, DTT 33 mM, EDTA 0,1 mM, MgSO₄ 3,74 mM, CoA 0,27 mM, luciferina 0,47 mM e ATP 0,53 mM). A coenzima A (CoA) permite um aumento cerca de 8 vezes superior da intensidade da luz emitida, mantendo-se constante, durante pelo menos um minuto. A medição foi efetuada recorrendo ao aparelho da Tecan Infinite 200 (Tecan, Switzerland). Todas as atividades do gene repórter foram normalizadas para a quantidade total de proteínas, presente nos extratos celulares, que foi determinada pelo método de *Bradford*, recorrendo a um conjunto de reagentes da Bio-Rad.

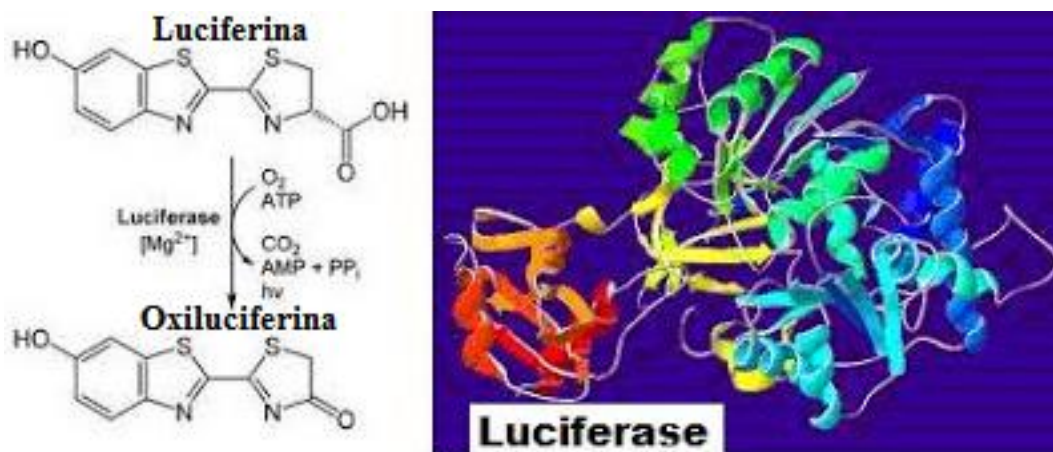


Figura 3.2 Reação de quimioluminescência catalisada pela luciferase.

3.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DO MTT

O grau de viabilidade celular foi determinado pelo teste do MTT (Thermo Fisher Scientific, USA). O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um sal tetrazólio hidrossolúvel de cor amarela. Este teste foi desenvolvido por Mosmann e baseia-se num ensaio colorimétrico, no qual o MTT é clivado, pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas, originando um produto de cor azul, designado por formazana que é insolúvel e por isso, precipita no final, sob a forma de cristais. O azul de formazana absorve a 560 nm e por isso, a sua formação pode ser quantificada através de um espectrofotómetro⁵³. As células foram lavadas 2 vezes com PBS. Posteriormente, as células foram incubadas com MTT 5 mg/ml a 37 °C, durante aproximadamente 45 minutos. No final, retirou-se o meio de incubação do MTT, tendo-se de seguida adicionado 1 ml de DMSO, para solubilizar o azul de formazana, e procedido à leitura da absorvância a 560 nm, ao fim de 10 minutos, no aparelho da Tecan Infinite 200 (Tecan, Switzerland).

3.9 ENSAIO COM O INIBIDOR NU7026

NU7026 (2-(4-morfolinil)-4H-nafto[1,2-b]pirano-4-um, ab120970) (Abcam, England) é um inibidor competitivo, dependente de ATP e específico para DNA-PK. Este composto tem um IC₅₀ de 230 nM e apesar de poder inibir outras enzimas da família PI3K, NU7026 é 60 vezes mais específico para DNA-PK⁵⁴. Foi preparada uma solução concentrada de 10 mM em DMSO que foi conservada a -20 °C. Uma segunda solução de trabalho foi preparada sempre que necessário, através da diluição do inibidor em DMSO para obter uma concentração de 2,5 mM, mantendo-se armazenada à temperatura de -4 °C, no final de cada ensaio. Antes do início de cada ensaio, a solução de trabalho foi mantida à temperatura ambiente, durante aproximadamente 1 h. Duas concentrações diferentes de inibidor correspondentes a 5 µM ou 10 µM foram adicionadas às células, num período de pré-incubação de 1h, antes de cada transfeção.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados estão representados como a média \pm SD (desvio padrão) de pelo menos três experiências independentes, cada uma correspondente a um ensaio em duplicado. A significância estatística foi determinada pelo teste *Student's t* emparelhado. Diferenças de *p value* inferior a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas. O software *Prism* da GraphPad v6.0 permitiu a realização de todas as análises estatísticas e como tal, a elaboração dos gráficos que constam dos resultados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DNA-PKcs É UM INTERVENIENTE NO PROCESSO DE TRANSATIVAÇÃO DO LTR DO HIV-1, MEDIADA POR TAT

Como já foi referido, tem sido proposto que o complexo DNA-PK, através da sua subunidade catalítica (DNA-PKcs), é importante para o processo de transativação do LTR do HIV-1 mediado por Tat, uma proteína necessária para a transcrição eficiente do genoma viral^{47,48,55}. Por conseguinte, analisou-se se DNA-PKcs poderia interagir com Tat, contribuindo para o aumento dos níveis de transativação do LTR viral. Através de várias experiências de transfeção, o promotor do LTR pequeno, integrado nas células HeLa-P4 (nt -138 a +80), foi estimulado com a proteína Tat, expressa a partir do plasmídeo pCMV-Tat, na presença ou ausência de duas quantidades diferentes de pCMV6DNA-PKcs (0,25 e 0,5 µg). A jusante do LTR pequeno, localiza-se o gene repórter da β -galactosidase, cuja expressão é regulada pelo promotor viral basal, integrado neste LTR. Um aumento da atividade deste gene repórter reflete um aumento dos níveis de transcrição. No final das transfeções, passado 48h, a expressão da β -galactosidase foi analisada (ver materiais e métodos).

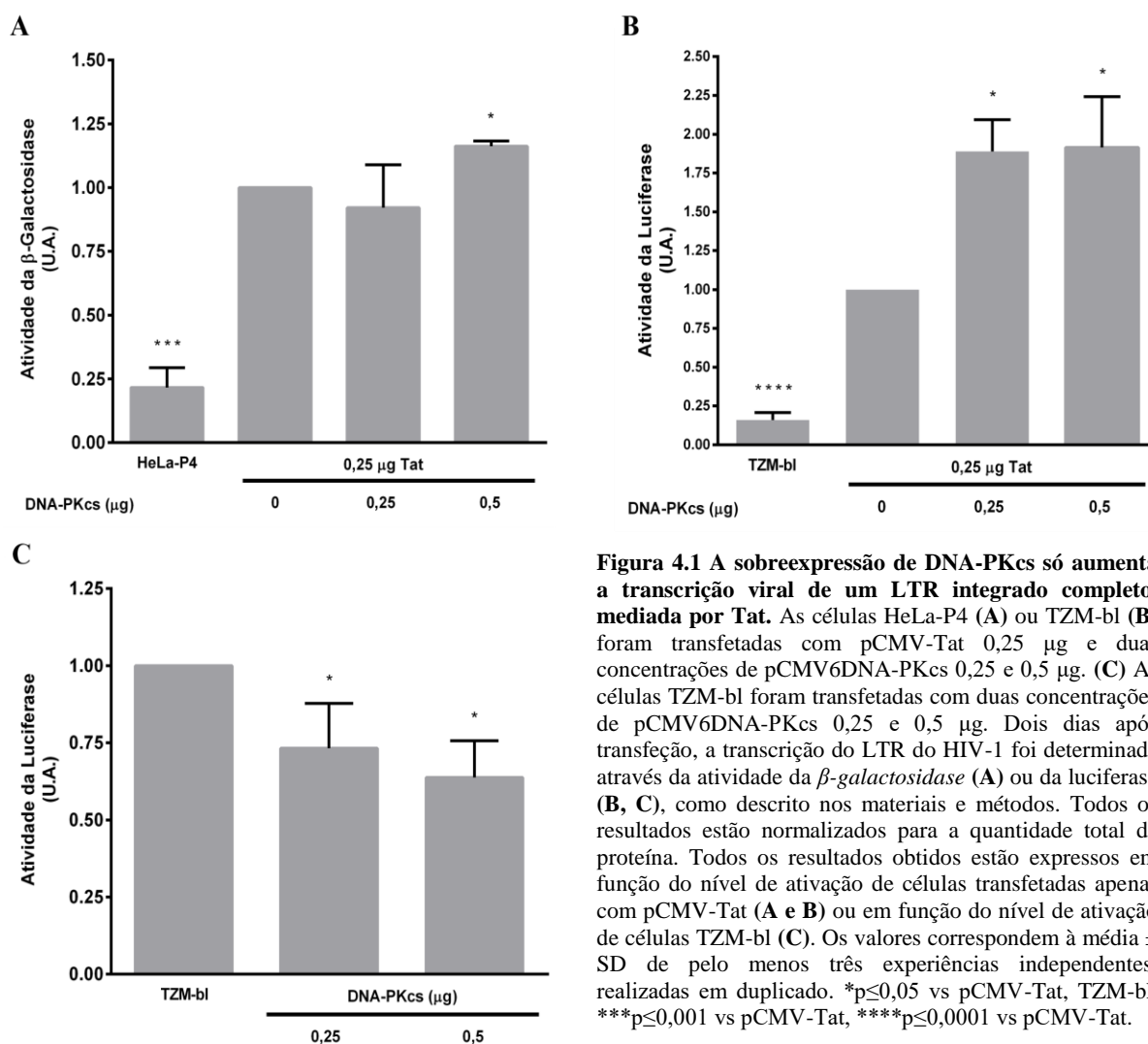


Figura 4.1 A sobreexpressão de DNA-PKcs só aumenta a transcrição viral de um LTR integrado completo, mediada por Tat. As células HeLa-P4 (A) ou TZM-bl (B) foram transfectadas com pCMV-Tat 0,25 µg e duas concentrações de pCMV6DNA-PKcs 0,25 e 0,5 µg. (C) As células TZM-bl foram transfectadas com duas concentrações de pCMV6DNA-PKcs 0,25 e 0,5 µg. Dois dias após transfeção, a transcrição do LTR do HIV-1 foi determinada através da atividade da β -galactosidase (A) ou da luciferase (B, C), como descrito nos materiais e métodos. Todos os resultados estão normalizados para a quantidade total de proteína. Todos os resultados obtidos estão expressos em função do nível de ativação de células transfectadas apenas com pCMV-Tat (A e B) ou em função do nível de ativação de células TZM-bl (C). Os valores correspondem à média \pm SD de pelo menos três experiências independentes, realizadas em duplicado. * $p \leq 0,05$ vs pCMV-Tat, TZM-bl, *** $p \leq 0,001$ vs pCMV-Tat, **** $p \leq 0,0001$ vs pCMV-Tat.

Contrariamente ao esperado, não se observou nenhum aumento dos níveis de transativação, mediada por Tat, na presença de qualquer uma das quantidades de pCMV6DNA-PKcs utilizadas (Figura 4.1A). Estes resultados não estão de acordo com as teorias referidas anteriormente que defendem a intervenção de DNA-PKcs, na transativação do LTR do HIV-1, mediada por Tat^{47,48}. Uma possível explicação para este problema poderá estar relacionada com o LTR pequeno, integrado no genoma das células HeLa-P4. Este LTR é pequeno, uma vez que tem um tamanho reduzido (nt -138 a +80), sendo constituído apenas pela região U3 incompleta (nt -138 a +1) e por parte da região R (nt +1 a +80). Portanto, optou-se por repetir a experiência, mas desta vez, recorrendo a células TZM-bl⁵⁶ porque têm um LTR de maior tamanho (nt -450 a +96) com todas as regiões que definem o LTR completo do HIV-1: U3, R e U5. O gene repórter da luciferase está sob o controlo deste LTR completo e a sua expressão foi analisada (ver materiais e métodos)⁵⁷. Um aumento da atividade da luciferase corresponde a um aumento dos níveis de transcrição, através do LTR viral.

Contrariamente ao observado previamente em células HeLa-P4, nas células TZM-bl observou-se um aumento dos níveis de transativação, na presença de Tat, para todas as quantidades de pCMV6DNA-PKcs testadas. A presença de 0,25 e 0,5 µg de pCMV6DNA-PKcs contribuiu para o aumento dos níveis de transativação do LTR viral, mediada por Tat, em $1,889 \pm 0,2036$ e $1,914 \pm 0,3287$, respetivamente (Figura 4.1B). Na ausência de Tat, DNA-PKcs não tem a capacidade de transativar o LTR do HIV-1, por si só, o que significa que o aumento dos níveis de transativação se deve a uma ação conjunta de DNA-PKcs com a proteína transativadora (Figura 4.1C). Assim, os resultados evidenciam a possibilidade de elementos *cis* estarem em falta no LTR pequeno das células HeLa-P4, que contribuem para aumentar os níveis de transativação do LTR do HIV-1, na presença de DNA-PKcs e da proteína transativadora. Estes elementos podem estar potencialmente localizados numa parte da região U3 (nt -450 a -138) e/ou na região U5 (nt +96 a +181) do LTR viral completo.

4.2 O LTR MÍNIMO TEM OS ELEMENTOS *CIS* NECESSÁRIOS PARA A AÇÃO DE DNA-PKCS COMO POSSÍVEL COFATOR DE TAT, NA TRANSATIVAÇÃO DO LTR DO HIV-1

Os resultados das experiências anteriores sugerem que os elementos *cis*, necessários para o aumento dos níveis de transativação do LTR do HIV-1, na presença de DNA-PKcs e de Tat, parecem estar localizados numa parte da região U3 (nt -450 a -138) e/ou na região U5 (nt +96 a +181) do LTR completo viral, uma vez que correspondem aos componentes em falta no LTR pequeno das células HeLa-P4. Estas regiões têm zonas que podem condicionar a expressão do LTR viral. A parte da região U3, que não está presente no LTR mínimo, engloba a região modulatória (nt -450 a -105), que tem um elemento NRE (*Negative Regulatory Element*) (nt -340 a -184), responsável pela regulação negativa do LTR, tendo em conta que deleções nesta região aumentam os níveis de transcrição viral³⁶. Estudos subsequentes também demonstraram que a região NRE é rica em elementos *cis*, que regulam a ativação ou repressão do LTR³⁸. Na extremidade 5' da região U3, foi identificado um quarto local de ligação para o fator de transcrição Sp1 (*Specificity Protein 1*) que parece ser essencial para a transcrição viral mas, no sentido inverso. Recentemente, na região U5 (nt +96 a +181), foram descritos motivos importantes, a nível transcricional³⁶. Portanto, na tentativa de localizar os elementos *cis* em falta, foram construídos três LTR diferentes, sendo que cada um foi clonado num vetor pGL3-basic com o gene repórter da luciferase integrado, a jusante. Os LTR diferem ao nível do tamanho, pela presença ou ausência das regiões que se pretende analisar se correspondem ou não aos elementos *cis* (ver materiais e métodos)⁵⁰. Por conseguinte, a cada construção realizada foi atribuído um nome diferente, consoante a dimensão do LTR: LTR mínimo (nt -115 a +96), LTR de tamanho intermédio (nt -454 a +96) e LTR completo (nt -454 a +181) (Figura 4.2A). A construção do LTR mínimo tem um tamanho e estrutura igual ao do LTR integrado nas células HeLa-P4 para confirmar se, de facto, não existe aumento dos níveis de transativação, a partir de um LTR de tamanho pequeno. A construção do

LTR de tamanho intermédio teve como objetivo averiguar se apenas a região U5 engloba elementos *cis* e a do LTR completo o propósito de concluir se ambas as regiões U3 e U5 integram elementos *cis*. Assim, várias experiências de transfecção foram efetuadas, em células 293T com os três LTR diferentes e pCMV-Tat, na presença ou ausência de duas quantidades de pCMV6DNA-PKcs (0,25 e 0,5 µg). Passados dois dias, a expressão do gene repórter da luciferase foi analisada (ver materiais e métodos).

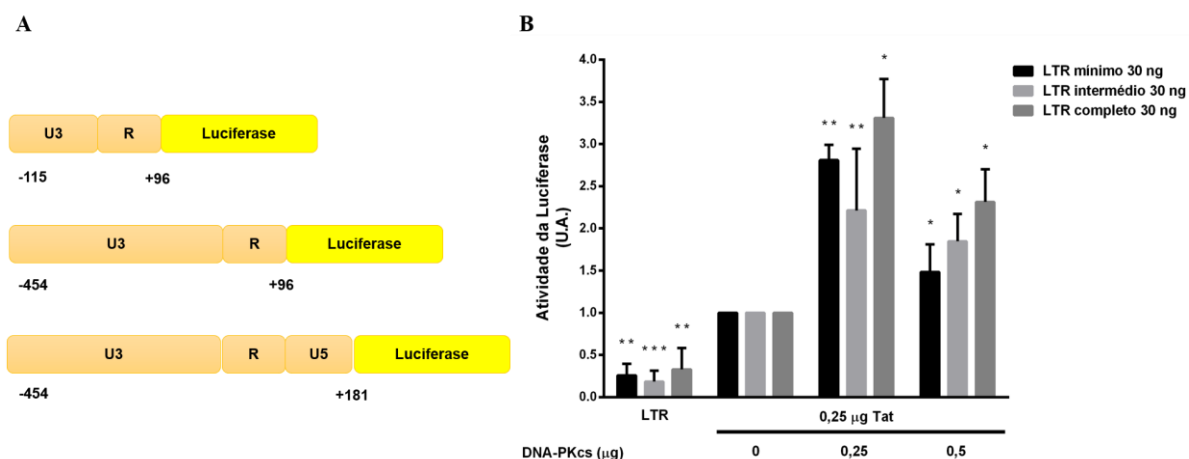


Figura 4.2 DNA-PKcs aumenta a transativação do LTR basal do HIV-1, estimulada pela Tat. (A) Representação esquemática dos três LTR de diferentes tamanhos, utilizados nas experiências de transfecção para identificação dos elementos *cis*. De cima para baixo, está representado o LTR mínimo (nt -115 a +96), o LTR intermédio (nt -454 a +96) e o LTR completo (nt -454 a +181). (B) As células 293T foram transfectadas com o plasmídeo repórter da luciferase pGL3-LTR 30 ng contendo três LTR de diferentes tamanhos (como indicado) apenas ou em combinação com pCMV-Tat 0,25 µg ou com pCMV-Tat 0,25 µg e pCMV6DNA-PKcs 0,25 e 0,5 µg. Dois dias após transfecção, a transcrição do LTR do HIV-1 foi determinada pela atividade da luciferase, como descrito nos materiais e métodos. Todos os resultados estão normalizados para a quantidade total de proteína. Todos os resultados estão expressos em função do nível de ativação de células 293T transfectadas com cada um dos LTR e pCMV-Tat (B). Os valores correspondem à média \pm SD de pelo menos três experiências independentes, cada uma correspondente a um ensaio em duplicado. * $p \leq 0,05$ vs pGL3-LTR + pCMV-Tat, ** $p \leq 0,01$ vs pGL3-LTR + pCMV-Tat, *** $p \leq 0,001$ vs pGL3-LTR + pCMV-Tat.

Os resultados obtidos demonstraram transativação dos três LTR, na presença de Tat (ou transativação normal), pois a média dos valores obtidos, após adição de pCMV-Tat, é superior à de cada LTR sozinho (Figura 4.2B). Estes valores confirmam a atuação, sem interferências, da proteína Tat como transativador transcrricional⁵⁸. Contrariamente ao esperado, os resultados permitem também perceber a contribuição de DNA-PKcs na transativação normal de todos os LTR, inclusive no mínimo, uma vez que, após adição de 0,25 ou 0,5 µg de pCMV6DNA-PKcs, os valores obtidos foram superiores à transativação de cada LTR, mediada pela proteína transativadora. Assim, em relação à transativação normal, observou-se um aumento de $2,808 \pm 0,1817$ para o LTR mínimo, de $2,562 \pm 0,2711$ para o LTR de tamanho intermédio e de $3,307 \pm 0,4624$ para o LTR completo para 0,25 µg de pCMV6DNA-PKcs (Figura 4.2B). Na presença de 0,5 µg de pCMV6DNA-PKcs, verificou-se um aumento de $1,251 \pm 0,07751$ para as células transfectadas com o LTR mínimo, um aumento de $1,846 \pm 0,3243$ com o LTR de tamanho intermédio e um aumento de $2,312 \pm 0,3871$ com o LTR completo (Figura 4.2B). Como se pode constatar, independentemente da quantidade de pCMV6DNA-PKcs utilizada, os valores de transativação do LTR completo, na presença de Tat e DNA-PKcs, foram superiores aos do LTR intermédio, o que anteciparia a possibilidade de localização dos elementos *cis* na parte da região U3, e/ou na região U5, em falta no LTR pequeno das células HeLa-P4 (nt -138 a +80). No entanto, os níveis de transativação do LTR mínimo foram muito semelhantes aos do LTR completo, e superiores aos do LTR intermédio, descartando a importância destas regiões, já que o LTR mínimo é constituído apenas pela região U3 incompleta e a região R, não apresentando sequer o segmento U5. Portanto,

estes resultados contradizem o que foi observado anteriormente em células HeLa-P4 e, por isso, os elementos *cis* presentes num LTR pequeno (nt -138 a +80) parecem ser suficientes para o aumento da transativação, na presença de Tat e DNA-PKcs.

Uma possível explicação para estes resultados divergentes poderá estar relacionada com modificações epigenéticas ao nível da cromatina, presentes num LTR integrado, que não existem num LTR transiente. O DNA eucariótico ou proviral encontra-se normalmente organizado em histonas e outras proteínas para formar cromatina, maioritariamente com dois objetivos. Em primeiro lugar, facilitar o armazenamento do DNA, numa forma altamente compacta. Em segundo lugar, facilitar a regulação da expressão genética, restringindo o acesso da maquinaria transcricional a genes provirais, do hospedeiro e a regiões regulatórias. Os nucleossomas são a unidade estrutural fundamental da cromatina. Cada nucleossoma é constituído por 147 pares de bases de DNA, envolvendo um octeto de proteínas composto pelas histonas H2A, H2B, H3 e H4, separadas por 80 nucleótidos de DNA *linker*, ao qual a histona H1 se liga⁵⁹. Através de estudos utilizando a nuclease micrococcal para digerir DNA proviral, foram identificados dois nucleossomas: nuc-0 (nt 40 a 200), e nuc-1 (nt 465 a 610) (Figura 1.2), que se formam após a integração do LTR viral no genoma da célula hospedeira. Estes nucleossomas regulam a atividade transcricional basal do LTR 5', porque ocupam os locais de ligação para vários fatores de transcrição chave, que regulam a expressão genética do HIV-1. O nucleossoma nuc-0 localiza-se na extremidade 5' do LTR e engloba uma parte de NRE (*negative regulatory element*), uma região silenciadora do promotor viral⁶⁰. No início da transcrição viral, ocorre o deslocamento de nuc-1 do local de início da transcrição (fronteira U3-R), onde se encontra localizado em condições basais, permitindo o acesso de fatores de transcrição, de iniciação e de elongação aos seus locais de ligação no LTR 5'. Para que assim aconteça, é necessário o recrutamento de HATs (*Histone Acetyltransferases*) para modificações pós-traducionais como a acetilação, e o recrutamento de um tipo específico de complexos SWI/SNF (PBAF)⁵⁹. A acetilação vai quebrar a ligação DNA-histonas e aumentar o acesso dos fatores de transcrição ao DNA, sendo regulada por um balanço entre acetiltransferases (HATs, *Histone Acetyltransferases*) e desacetilases (HDACs, *Histone Deacetylases*). A presença de muitas HDACs está associada a um baixo nível de acetilação e, por conseguinte à repressão da transcrição viral⁶¹. O recrutamento de complexos SWI/SNF (BAF) e metiltransferases, que catalisam a trimetilação de histonas também contribuem para impedir a transcrição. Estas modificações pós-traducionais repressivas permitem a manutenção de nuc-1 e por conseguinte, impedem a ligação de fatores de transcrição e coativadores ao DNA nessa região⁵⁹. Desta forma, os baixos níveis de transativação observados em células HeLa-P4, na presença de Tat e DNA-PKcs, podem ser explicados pelo acesso limitado da subunidade catalítica aos elementos *cis*. Como o LTR pequeno se encontra integrado no genoma destas células, o acesso aos elementos *cis* pode estar a ser bloqueado pela localização dos mesmos, nas proximidades ou sobre o nucleossoma nuc-1. Nestas regiões, o DNA encontra-se numa forma altamente compacta, o que impede a ligação de DNA-PKcs e a sua interação com Tat, no processo de transativação do LTR do HIV-1.

Mas estará DNA-PKcs mesmo a atuar em conjunto com a proteína Tat ou apenas isoladamente, no aumento da transativação do LTR viral, observado nas experiências efetuadas? A subunidade catalítica de DNA-PK pode estar a transativar cada um dos LTR, o que explicaria o tal aumento dos níveis de transativação, observado anteriormente. DNA-PKcs pode ainda estar a ativar o promotor CMV, presente no seu próprio plasmídeo, pCMV6DNA-PKcs, levando ao aumento dos seus níveis intracelulares. Portanto, caso se confirmasse que a subunidade catalítica tem a capacidade de transativar os três LTR, o aumento dos níveis de transativação também poderia ser explicado pela capacidade de DNA-PKcs ativar o seu próprio promotor. O promotor CMV está igualmente integrado no plasmídeo da proteína Tat, pCMV-Tat, por isso, pode levantar-se a hipótese de DNA-PKcs também estar a ativar o promotor deste plasmídeo, levando a um "burst" de proteínas Tat e como consequência,

ao aumento observado dos níveis de transcrição, a partir do LTR viral. Assim, com o objetivo de analisar estas três últimas possibilidades e apoiar o papel da subunidade catalítica como cofactor de Tat na transativação do LTR, realizaram-se novas experiências de transfeção.

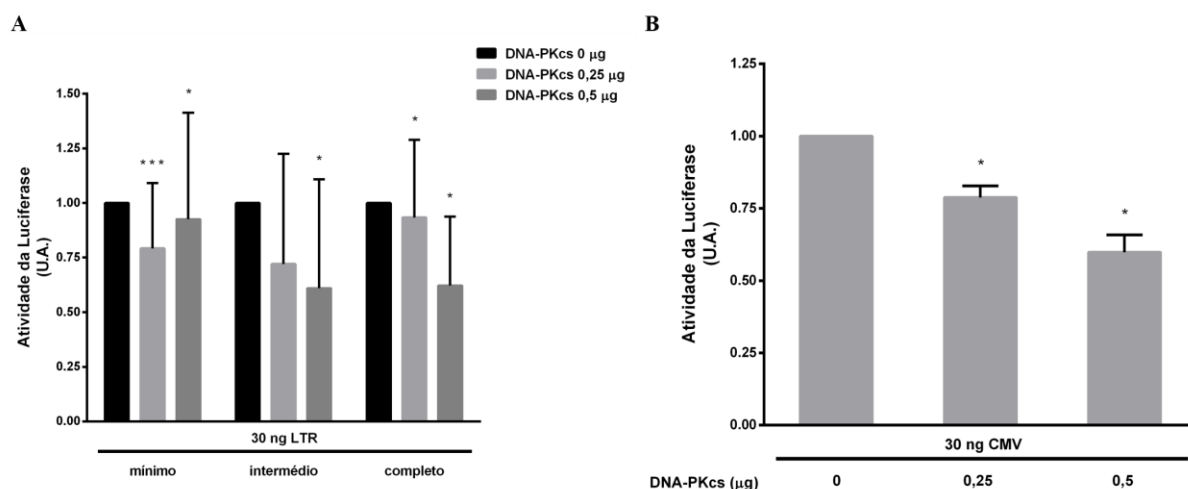


Figura 4.3 DNA-PKcs não ativa por si só o promotor LTR do HIV-1 ou o promotor CMV. Experiências de controlo para excluir a hipótese de DNA-PKcs não ativar por si só os diferentes LTR do HIV-1 e pCMV. As células 293T foram transfectadas apenas com o plasmídeo repórter da luciferase pGL3-LTR 30 ng contendo três LTR de diferentes tamanhos (como indicado) (A) ou só com pGL3-CMV 30 ng (B) ou em combinação com pCMV6DNA-PKcs 0,25 ou 0,5 µg (A e B). Dois dias após transfeção, a atividade da luciferase foi analisada, como descrito nos materiais e métodos. Os resultados estão normalizados para a quantidade total de proteína. Os resultados obtidos estão expressos em função do nível de ativação de células 293T transfectadas com cada um dos três LTR (A) ou com pGL3-CMV (B). Os valores correspondem à média \pm SD de pelo menos três experiências independentes, cada uma correspondente a um ensaio em duplicado. * $p \leq 0,05$ vs pGL3-LTR, pGL3-CMV *** $p \leq 0,001$ vs pGL3-LTR.

Células 293T foram transfectadas com os três LTR em separado e duas quantidades de pCMV6DNA-PKcs (0,25 ou 0,5 µg). Após medição da quimiluminescência, passado 48h, não se verificou nenhum aumento da atividade da luciferase, o que significa que DNA-PKcs não tem a capacidade de transativar, por si só, qualquer um dos três LTR virais (Figura 4.3A). Quando se transfectou novas células 293T mas, desta vez, com o promotor CMV, integrado nos plasmídeos pCMV6DNA-PKcs e pCMV-Tat, também se verificou a incapacidade de DNA-PKcs para transativar por si só, este promotor (Figura 4.3B). Estes resultados excluem a hipótese de DNA-PKcs funcionar como transativador viral de qualquer um dos promotores e apoiam o possível envolvimento da subunidade catalítica como cofator da proteína Tat, no processo de transativação do LTR do HIV-1.

Por último, é de notar que os valores de transativação obtidos para 0,25 µg de pCMV6DNA-PKcs foram mais elevados, relativamente a 0,5 µg (Figura 4.3A). Estes valores podem estar a evidenciar um comportamento de maior sensibilidade, de qualquer um dos LTR a quantidades mais reduzidas de DNA-PKcs. Todavia, para confirmar este comportamento, mais experiências deverão ser realizadas, tendo em conta que nas células HeLa-P4 e TZM-bl foi observado o contrário (Figura 4.1A, B).

4.3 OS LOCAIS DE LIGAÇÃO PARA SP1 SÃO UM DOS ELEMENTOS *CIS* NECESSÁRIOS PARA A AÇÃO DE DNA-PKCS, NA TRANSATIVAÇÃO NORMAL DO LTR DO HIV-1

Previamente, verificou-se que o LTR mínimo parece ter os elementos *cis* necessários para a ação de DNA-PKcs, na transativação normal do LTR do HIV-1. O LTR mínimo é constituído apenas pela região U3 incompleta (nt -115 a +1) e a região R (nt +1 a +96). A região U3 incompleta compreende uma região *enhancer* (nt -105 a -78) e a região correspondente ao promotor basal (nt -78 a +1)³⁶. A região *enhancer* tem dois locais de ligação para NF- κ B e o promotor basal tem três locais de ligação

para Sp1. Segundo estudos recentes, estes locais de ligação parecem ser os elementos chave envolvidos na regulação da transcrição, a partir do LTR viral⁶².

Em particular, existem vários estudos que demonstram a importância dos locais de ligação para Sp1, no processo de transativação normal do LTR. Por exemplo, Harrich *et al* (1989) confirmaram que mutações nos três locais de ligação para Sp1 levam a uma redução drástica da transativação viral, mediada por Tat⁶³. Huang *et al* (1993) também denotam a relevância destes locais, ao provarem que um aumento na distância Sp1-TATAA, entre os nucleótidos 18 a 101, através da inserção de sequências aleatórias de tamanhos diferentes, levou a uma inibição na expressão e consequente replicação do HIV-1⁶⁴. Para além disto, Jones *et al* (1986) induziram mutações por substituição, em apenas um ou nos três locais de ligação para Sp1, observando um impedimento da ligação deste fator de transcrição a esses locais e, consequente redução na eficiência da transcrição *in vitro*³⁹. Kamine *et al* (1992) demonstraram que mutações numa proteína Tat quimérica direcionada à região promotora, através de um domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição GAL4, tem a capacidade de ativar promotores sintéticos com sequências *consensus* para a ligação do fator de transcrição Sp1 e a sequência TATA⁶⁵. Chun *et al* (1998) defendem a formação de um complexo interacional entre o complexo DNA-PK, o fator de transcrição Sp1 e a proteína Tat, contribuindo para o aumento da transativação do LTR do HIV-1. Neste caso, os locais de ligação para Sp1 são necessários, tendo em conta que DNA-PK precisa de se ligar aos mesmos ou próximo destes para fosforilar Sp1, através da sua subunidade catalítica⁴⁷.

Assim, colocou-se a hipótese dos elementos *cis*, correspondentes aos locais de ligação para Sp1, serem suficientes para DNA-PKcs aumentar a atividade de Tat, na transativação do LTR. Em consequência, um LTR com a designação de LTRSp1, apenas com a região do promotor basal (nt -78 a +1) e a região R (nt +1 a +96), pGL3-LTRSp1 (nt -78 a +96), foi construído (Fig. 4.4C). Como vetor molde, selecionou-se um dos três LTR, que têm o gene repórter da luciferase integrado, e após a amplificação do inserto por PCR, efetuou-se a ligação deste com o vetor (ver materiais e métodos). A identificação dos elementos *cis* necessários para a sinergia observada, entre Tat e DNA-PKcs, na transativação do LTR viral, permitirá identificar com maior precisão outros fatores de transcrição envolvidos e por conseguinte, os mecanismos subjacentes a este sinergismo.

Obtido o LTR pretendido, experiências de transfeção em células 293T foram efetuadas. A atividade transcricional de LTRSp1 foi analisada, passados dois dias, a partir da expressão do gene repórter da luciferase. Em todas as transfeções celulares com pGL3-LTRSp1 e pCMV-Tat, observou-se um aumento dos níveis de transcrição, que se traduziu num aumento da atividade da luciferase em $9,149 \pm 5,908$ (Figura 4.4A). Estes dados permitem constatar que a transativação do LTR viral por Tat pode acontecer, apenas na presença dos locais de ligação para o fator de transcrição Sp1.

A adição de duas quantidades diferentes de pCMV6DNA-PKcs (0,25 ou 0,5 μ g) contribuiu para um aumento mais elevado dos níveis de transcrição, relativamente aos níveis obtidos nas transfeções apenas com pCMV-Tat e pGL3-LTRSp1. Na presença de 0,25 μ g de pCMV6DNA-PKcs, registou-se um aumento de $1,641 \pm 0,3894$. Todavia, na presença de 0,5 μ g de pCMV6DNA-PKcs, não houve aumento, mas os dados obtidos também não são estatisticamente significativos (Figura 4.4B). Tendo em conta estes valores, é possível perceber novamente uma atividade sinérgica, entre Tat e DNA-PKcs, para aumentar a transativação do LTR viral, mas apenas na presença da quantidade menor de DNA-PKcs. Todavia, estes resultados não estão de acordo com os resultados obtidos, nas experiências em que se utilizaram os três LTR de diferentes tamanhos, no sentido em que se registou um aumento bem mais elevado dos níveis de transcrição, na presença de pCMV-Tat para as duas quantidades de pCMV6DNA-PKcs (Figura 4.2B). Deste modo, estes resultados parecem também evidenciar a importância dos locais de ligação para NF- κ B no aumento do processo de transativação normal do LTR viral, na presença de DNA-PKcs. Esta hipótese está de acordo com os resultados de Zeichner *et*

al (1991) e de Li *et al* (2001), que demonstraram que a remoção dos locais de ligação para NF- κ B provoca uma diminuição dos níveis de transativação, a partir do LTR do HIV-1^{66,67}.

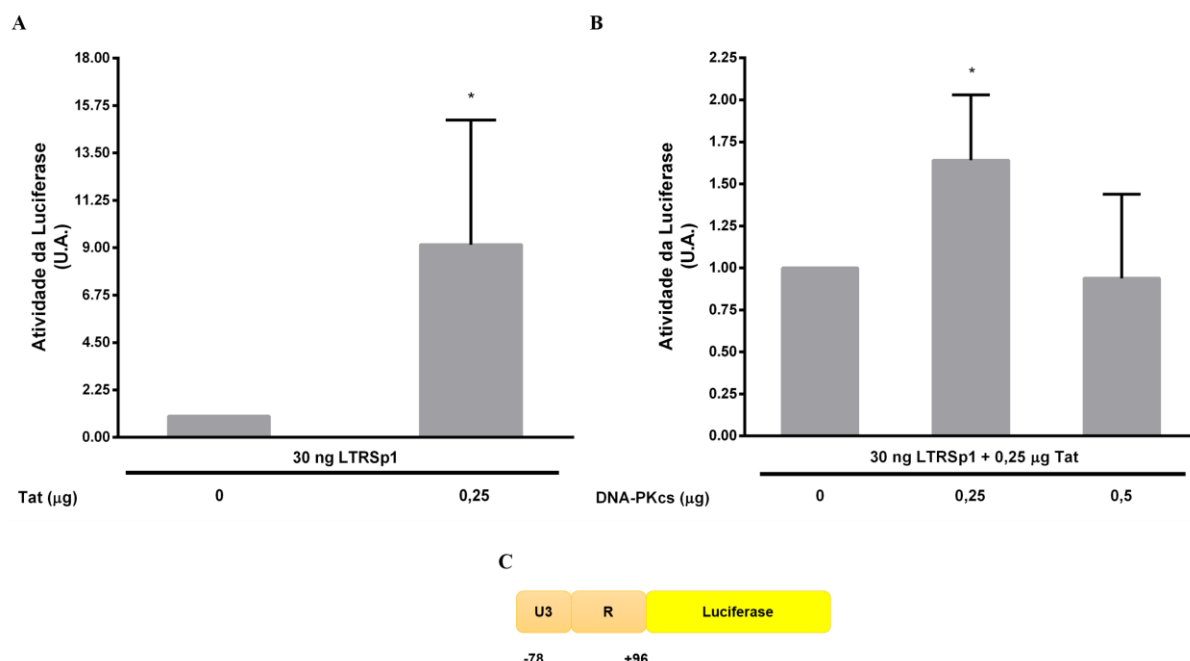


Figura 4.4 Os três locais Sp1, no promotor LTR basal, são suficientes para DNA-PKcs aumentar a transativação do LTR, regulada por Tat. **(A)** As células 293T foram transfectadas com o plasmídeo pGL3-LTRSp1 30 ng, contendo o novo LTR (nt -78 a +96) e o gene repórter da luciferase, na ausência ou presença de pCMV-Tat 0,25 µg. **(B)** As células 293T foram transfectadas com pGL3-LTRSp1 30 ng e pCMV-Tat 0,25 µg, na ausência ou presença de pCMV6DNA-PKcs 0,25 ou 0,5 µg. Dois dias após transfeção, a atividade da luciferase foi analisada (ver materiais e métodos). **(C)** Representação esquemática do novo LTR (nt -78 a +96) construído para identificação dos elementos *cis*. Os resultados estão normalizados para a quantidade total de proteína. Os resultados estão representados em função do nível de ativação de células transfectadas com pGL3-LTRSp1 (**A**) ou pGL3-LTRSp1 e pCMV-Tat (**B**). Os valores são a média \pm SD de pelo menos três experiências independentes, em duplicado. * $p \leq 0,05$ vs pGL3-LTRSp1, pGL3-LTRSp1 + pCMV-Tat.

Chun *et al* (1998) também induziram mutações nos locais de ligação para NF- κ B e verificaram uma diminuição da expressão genética viral, embora não muito significativa⁶⁸. Aliás, de acordo com Perkins *et al* (1993) parece haver uma espécie de cooperatividade entre os locais de ligação para Sp1 e NF- κ B, essencial para o aumento de transativação do LTR do HIV-1⁶⁹.

Assim, apesar dos locais de ligação para NF- κ B também poderem ser elementos *cis* importantes na atividade de DNA-PKcs ao nível do promotor do LTR, é possível constatar de acordo com os resultados obtidos, que os locais de ligação para Sp1, presentes no promotor viral, são um dos elementos *cis* necessários para a atividade sinérgica observada entre Tat e 0,25 µg de DNA-PKcs, no processo de transativação do LTR do HIV-1.

4.4 DNA-PKCS REGULA A TRANSCRIÇÃO DO LTR DO HIV-1, ATRAVÉS DA SUA ATIVIDADE CINÁSICA

Como já foi referido, DNA-PK é uma cinase nuclear constituída por uma subunidade catalítica (DNA-PKcs) e pelas subunidades Ku70/Ku80⁴⁸. No sentido de confirmar se o aumento da expressão do LTR viral se deve à atividade cinásica de DNA-PKcs e não a outro tipo de ação, por exemplo, em conjunto com as subunidades Ku70/Ku80, utilizou-se um inibidor específico para DNA-PKcs. NU7026 foi descrito como sendo um inibidor da atividade catalítica de DNA-PK e por conseguinte, atua especificamente sobre a atividade da subunidade catalítica⁷⁰.

Assim, células TZM-bl foram tratadas com duas quantidades de inibidor NU7026 (5 μ M e 10 μ M), e passado 1 hora, transfectadas com 0,25 μ g de pCMV-Tat e de pCMV6DNA-PKcs (ver materiais e métodos). A quantidade de DNA-PKcs utilizada foi de 0,25 μ g, uma vez que os níveis de transativação foram mais elevados, na presença desta quantidade (Figura 4.2B) e, por isso, a probabilidade de não haver transativação e consequentemente, a obtenção de um resultado não viável, é menor. Passados 48h, a atividade da luciferase foi analisada, por medição da quimioluminescência.

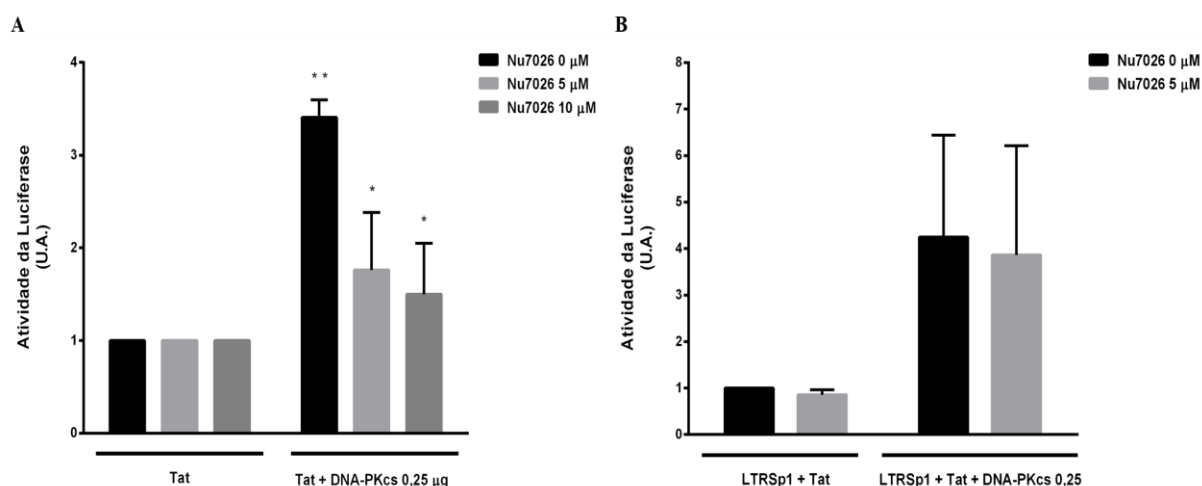


Figura 4.5 DNA-PKcs regula a transcrição do LTR do HIV-1, através da sua atividade cinásica. (A) As células TZM-bl foram incubadas com duas concentrações de inibidor NU7026 5 e 10 μ M, tendo 1 h após a incubação, sido transfectadas apenas com pCMV-Tat 0,25 μ g ou pCMV-Tat 0,25 μ g e pCMV6DNA-PKcs 0,25 μ g. (B) As células 293T foram ou não incubadas com NU7026 5 μ M, 1 hora antes da transfeção com pGL3-LTRSp1 30 ng e pCMV-Tat 0,25 μ g, ou co-transfeção com pGL3-LTRSp1 30 ng, pCMV-Tat 0,25 μ g e pCMV6DNA-PKcs 0,25 μ g. Dois dias após transfeção, a atividade do gene repórter da luciferase foi analisada (ver materiais e métodos). Os resultados estão normalizados para a quantidade total de proteína. Os valores obtidos estão representados em função do nível de ativação de células TZM-bl transfectadas com pCMV-Tat, tratadas ou não com NU7026 (A) ou em função de células 293T transfectadas com pGL3-LTRSp1 e pCMV-Tat, tratadas ou não com NU7026 (B). Os valores estão definidos como a média \pm SD de pelo menos três experiências independentes, efetuadas em duplicado. * $p \leq 0,05$ vs pCMV-Tat, ** $p \leq 0,01$ vs pCMV-Tat.

Os resultados das experiências demonstraram que a inibição da atividade cinásica de DNA-PKcs leva a uma supressão drástica da transcrição, a partir do LTR viral. Na presença de 5 μ M de NU7026, observou-se uma redução considerável dos níveis de transcrição de aproximadamente $1,644 \pm 0,428$ (Figura 4.5A). No entanto, a inibição da transcrição foi maior, na presença da concentração mais elevada do inibidor (10 μ M), levando a uma diminuição de cerca de $1,908 \pm 0,3597$ (Figura 4.5A). Estes dados apoiam os trabalhos de Tyagi *et al* (2011) e Chun *et al* (1998) que defendem que o complexo DNA-PK aumenta a transativação do LTR do HIV-1, mediada por Tat, através da atividade cinásica da sua subunidade catalítica (DNA-PKcs)^{47,48}. Mas de que forma este processo poderá estar a ocorrer?

Chun *et al* (1998) observaram que o complexo DNA-PK parece estabelecer uma ligação direta com os resíduos de aminoácidos 73 a 101 da proteína Tat, que por sua vez se liga a Sp1, através dos resíduos 1 a 55, o que leva a que a proteína transativadora funcione como uma "ponte", promovendo a proximidade entre DNA-PK e o fator de transcrição Sp1. Esta ligação permite a formação de um complexo interacional mais coeso e estável, que promove a fosforilação de Sp1, pela subunidade catalítica DNA-PKcs, traduzindo-se no consequente aumento dos níveis de transcrição, a partir do LTR viral. No entanto, Chun *et al* (1998) também defendem outra hipótese, na qual Tat pode não necessariamente entrar em contacto direto com DNA-PK e apenas estabelecer ligação com Sp1, alterando a sua conformação e, por conseguinte, tornando-o um melhor substrato para a cinase DNA-PK (Figura 4.6)⁴⁷. Apoiando a primeira hipótese de Chun *et al* (1998), Tyagi *et al* (2011) clarificam a

atuação de DNA-PKcs, demonstrando que fosforila a proteína Tat, nos resíduos de aminoácidos de serina nas posições 62 e 16. A serina na posição 62 localiza-se ao lado da região básica de Tat, o que sugere que a sua fosforilação permite modular a transativação do promotor do LTR do HIV-1 de diferentes formas, afetando por exemplo, a interação de Tat com a sequência TAR ou alterando a sua localização nuclear. A serina na posição 16 localiza-se no domínio N-terminal que é também um domínio essencial para a atividade de transativação eficiente da proteína Tat. Para confirmar o significado funcional da fosforilação de Tat por DNA-PKcs, Tyagi *et al* (2011) transfetaram células Jurkat-pHR'P-Luc (linha de células T com o provírus do HIV e o gene repórter da luciferase integrado no genoma) e várias construções de Tat mutantes nas serinas 16 e 62. Os valores obtidos nos ensaios de luciferase confirmaram a incapacidade de transativação pela proteína Tat, quando não há fosforilação dos resíduos de serina 16 e 62, pela subunidade catalítica (DNA-PKcs) do complexo DNA-PK⁴⁸.

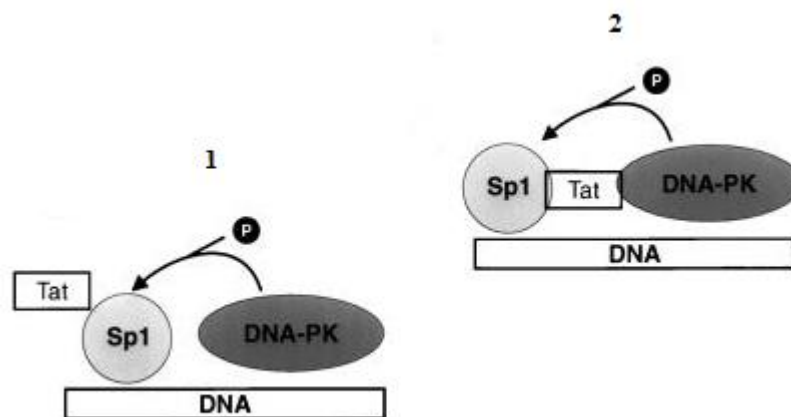


Figura 4.6 Esquemas que descrevem as hipóteses de interação de DNA-PK-Sp1-Tat. (1) A proteína Tat liga-se a Sp1, tornando-o um melhor substrato para DNA-PK, sem entrar em contacto direto com a cinase. (2) DNA-PK estabelece ligação direta com a proteína Tat, que se liga ao fator de transcrição Sp1, promovendo a proximidade entre DNA-PK e este fator. Adaptado de *Journal of Virology* © 1998, American Society for Microbiology.

Nas experiências anteriores, chegou-se à conclusão que os locais de ligação para Sp1 são um dos elementos *cis* necessários para o aumento da transativação do LTR viral, na presença de Tat e DNA-PKcs (Figura 4.4B). Como foi referido anteriormente, Chun *et al* (1998) defendem que DNA-PK exerce a sua atividade cinásica, através da sua subunidade catalítica, nos locais de ligação para Sp1 ou próximo destes, para ficar em proximidade de Sp1 e fosforilar este fator de transcrição, no resíduo de serina 131. Este processo desencadeia a transativação do LTR, na presença de Tat. Desta forma, na transativação normal do LTRSp1, o complexo DNA-PK também poderá estar a utilizar a sua atividade cinásica, através de DNA-PKcs.

Para testar esta hipótese, realizaram-se novos ensaios de transfeção, mas desta vez com pGL3-LTRSp1. Grupos de células 293T foram incubadas com NU7026 durante 1h e, posteriormente transfetadas com os plasmídeos pGL3-LTRSp1, pCMV-Tat e 0,25 µg de pCMV6DNA-PKcs. A concentração de inibidor selecionada foi de 5 µM, uma vez que com esta concentração já é possível observar inibição ou não da atividade cinásica, de acordo com as experiências anteriores (Figura 4.5A). Após adição do inibidor, observou-se uma redução da transativação o que está em conformidade com os resultados anteriores, todavia os valores obtidos não têm significância estatística (Figura 4.5B). Portanto, a tendência de redução dos níveis de transcrição está presente, mas teriam de

ser efetuados mais ensaios para se obter significância estatística e por conseguinte, ter mais dados para apoiar a hipótese dos locais de ligação para Sp1 corresponderem a um dos elementos *cis*, necessários para a transativação do LTR do HIV-1, na presença de Tat e DNA-PKcs.

4.5 A VIABILIDADE CELULAR NÃO FOI AFETADA POR PCMV-TAT, PCMV6DNA-PKcs E NU7026

Os plasmídeos utilizados nas transfeções e o inibidor NU7026 podem estar a contribuir para alguma citotoxicidade celular e por conseguinte, afetar a viabilidade das células, utilizadas nas experiências. Para excluir essa hipótese, a viabilidade celular de TZM-bl foi determinada, através do teste do MTT. Este teste foi desenvolvido por Mosmann e consiste num ensaio colorimétrico que depende da redução do sal *tetrazolium* pelas células vivas no azul de formazana, que absorve a 530 nm, sendo a sua formação quantificada através de um espectrofotómetro (ver materiais e métodos)⁵³.

A viabilidade celular não foi alterada, após transfeções com as duas quantidades do plasmídeo pCMV6DNA-PKcs (Figura 4.7A). No entanto, nas células co-transfetadas com pCMV-Tat e pCMV6DNA-PKcs, observou-se uma diminuição da viabilidade, mas não foi drástica (Figura 4.7B).

Sob o efeito do inibidor NU7026 (5 μ M e 10 μ M), a viabilidade celular também se manteve (Figura 4.7C). Deste modo, é possível admitir que os resultados das experiências não foram afetados por determinado efeito dos compostos e plasmídeos utilizados neste trabalho experimental.

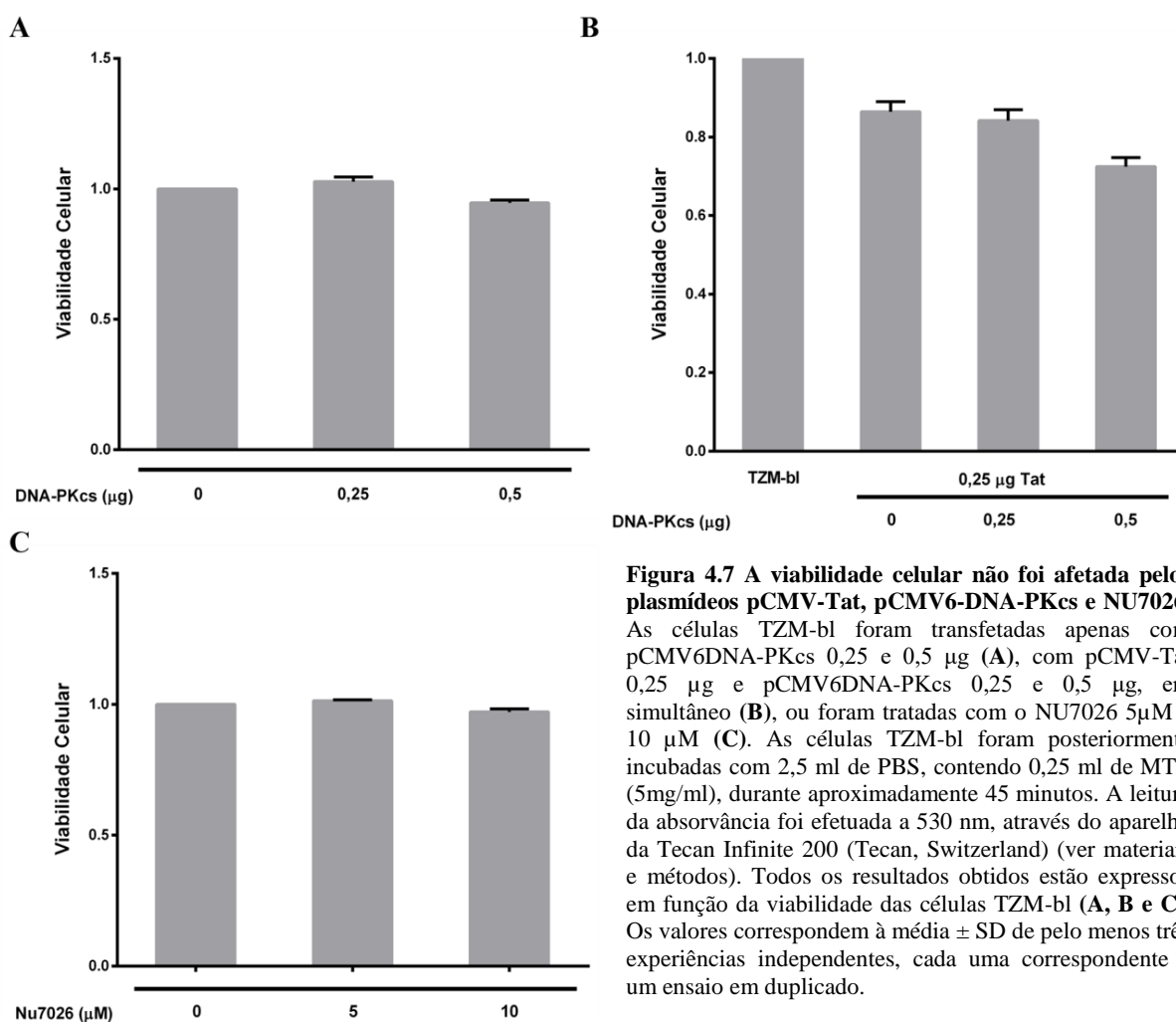


Figura 4.7 A viabilidade celular não foi afetada pelos plasmídeos pCMV-Tat, pCMV6-DNA-PKcs e NU7026. As células TZM-bl foram transfetadas apenas com pCMV6DNA-PKcs 0,25 e 0,5 μ g (A), com pCMV-Tat 0,25 μ g e pCMV6DNA-PKcs 0,25 e 0,5 μ g, em simultâneo (B), ou foram tratadas com o NU7026 5 μ M e 10 μ M (C). As células TZM-bl foram posteriormente incubadas com 2,5 ml de PBS, contendo 0,25 ml de MTT (5mg/ml), durante aproximadamente 45 minutos. A leitura da absorvância foi efetuada a 530 nm, através do aparelho da Tecan Infinite 200 (Tecan, Switzerland) (ver materiais e métodos). Todos os resultados obtidos estão expressos em função da viabilidade das células TZM-bl (A, B e C). Os valores correspondem à média \pm SD de pelo menos três experiências independentes, cada uma correspondente a um ensaio em duplicado.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho permitiu elucidar o papel da subunidade catalítica de DNA-PK (DNA-PKcs), no processo de transcrição do HIV-1. Até então pensava-se que poderia estar a atuar como cofator, mas não se sabia ao certo de que forma. Muitos dos trabalhos de investigação nesta área, implicavam a presença deste complexo, ao nível da integração do HIV-1, tendo em conta a sua função principal de reparação de quebras no DNA de cadeia dupla, via NHEJ. No entanto, outros trabalhos como o de Chun *et al* (1998) e Tyagi *et al* (2011) começaram a surgir, sugerindo que o complexo DNA-PK, através de DNA-PKcs, encontrava-se envolvido ao nível do processo de transcrição do HIV-1 e não de integração^{47,48}. Neste laboratório, observou-se que o silenciamento de DNA-PKcs, através da utilização de shRNAs, resulta numa diminuição dos níveis de transcrição viral, constituindo mais uma evidência de que DNA-PK pode estar envolvido na transcrição, a partir do LTR viral (*HIV-1 Long-Terminal Repeat*)⁴⁹.

Assim, este trabalho focou-se na avaliação do papel da subunidade catalítica DNA-PKcs, ao nível do processo de transcrição do HIV-1. Para tal, recorreu-se fundamentalmente a dois ensaios principais que permitiram avaliar em cada etapa do trabalho os níveis de transcrição, a partir do LTR viral. O ensaio a que se recorreu predominantemente foi o da luciferase, tendo-se realizado no início o ensaio da β -galactosidase.

Inicialmente, os resultados demonstraram que DNA-PKcs parecia ser um fator dispensável, contrariamente ao que se estava à espera e aos trabalhos já existentes. Todavia, rapidamente se levantou a hipótese que o problema poderia residir ao nível do LTR, presente nas células HeLa-P4, que era mais pequeno (nt -138 a +80) que o LTR normal do HIV-1. Assim, em células TZM-bl, com um LTR completo (nt -450 a +96), de tamanho semelhante ao LTR normal do HIV-1, os níveis de transcrição subiram e, por isso, constatou-se que os elementos *cis* ausentes, no LTR de HeLa-P4, poderiam ser o problema (Figura 4.1).

Para testar essa hipótese e averiguar quais os elementos *cis* cruciais para a ação de DNA-PKcs, construíram-se LTR de diferentes tamanhos, um de tamanho pequeno designado por mínimo (nt -115 a +96), um intermédio (nt -454 a +96) e um com o tamanho total (nt -454 a +181). Para surpresa, no final de todas as experiências de transfeção, os níveis de transcrição foram superiores aos da transativação normal, mesmo no LTR mínimo, de dimensões muito semelhantes ao LTR pequeno, integrado nas células HeLa-P4 (Figura 4.2). O problema poderia estar nas modificações epigenéticas, presentes no LTR pequeno integrado das células HeLa-P4, que não existem num LTR transiente.

Ao interpretar os resultados, levantou-se a questão se os níveis de transativação elevados seriam devido à ação de DNA-PKcs como cofator de Tat ou simplesmente, por também estar a funcionar como proteína ativadora dos promotores dos plasmídeos, utilizados nas transfeções. No entanto, os resultados demonstraram também que DNA-PKcs não consegue ativar por si só nem o promotor dos diferentes LTR, nem o promotor CMV, presente no seu próprio plasmídeo e no plasmídeo de Tat (Figura 4.3). Assim, DNA-PKcs parecia estar a funcionar como cofator de Tat mas de que forma isso poderia estar a acontecer? Apenas através da sua atividade cinásica ou a outro tipo de ação, por exemplo, em conjunto com as subunidades Ku70/Ku80, que constituem o complexo DNA-PK, na sua totalidade? Um inibidor NU7026, específico para a atividade catalítica de DNA-PK, foi utilizado e após medição da atividade da luciferase, por quimioluminescência, não se observou qualquer sinal de transativação aumentada (Figura 4.5), o que apoia as hipóteses de Chun *et al* (1998) e Tyagi *et al* (2011).

Portanto, estes resultados permitiram concluir que DNA-PKcs pode estar a atuar como cofator de Tat e que o LTR pequeno das células HeLa-P4 tem os elementos *cis* necessários para a ação de DNA-PKcs, no processo de transcrição do HIV-1.

Deste modo, faltava identificar mais em concreto quais seriam esses elementos. O LTR pequeno das células HeLa-P4 tem a região U3 incompleta (nt -138 a +1) e parte da região R (nt +1 a +80). De acordo com estudos recentes, os locais de ligação para os fatores de transcrição Sp1 e NF-kB parecem ser os elementos chave envolvidos na regulação da transcrição, e fazem parte exatamente da região U3 incompleta. Em particular, existem vários estudos que demonstram a importância dos locais de ligação para Sp1, no processo de transativação normal do LTR viral, mesmo na ausência de locais de ligação para NF-kB. Por conseguinte, construiu-se um LTR muito pequeno (nt -78 a +1), designado por LTRSp1, apenas com a região do promotor basal e a região R. Observou-se um aumento na transativação viral, na presença de DNA-PKcs (Figura 4.4), mas não foi tão elevado como registado nos outros LTR (Figura 4.2), nos quais os locais de ligação para NF-kB estão presentes, o que significa que os locais de ligação para Sp1 parecem ser um dos elementos *cis*, mas não os únicos necessários.

Em paralelo, foram sendo efetuadas várias experiências de viabilidade celular para excluir a possibilidade dos resultados serem afetados por esse parâmetro. Os níveis de viabilidade foram sempre elevados (Figura 4.7), corroborando desta forma a hipótese de que DNA-PKcs colabora com a proteína Tat, numa forma de sinergismo, contribuindo para o aumento dos níveis de transativação, a partir do LTR do HIV-1. Para tal, DNA-PKcs precisa dos elementos *cis*, sendo uns dos quais os locais de ligação para o fator de transcrição Sp1.

Mas serão todos os locais de ligação para Sp1 essenciais para que este fenómeno aconteça? Para identificar o papel de cada um dos locais de ligação para Sp1 na transcrição do HIV-1 basal e mediada por Tat, experiências de mutagénese dirigida deverão ser efetuadas. As mutações devem levar à alteração individual dos três locais de ligação para Sp1: I, II e III. Em seguida, podem ser integradas em três conjuntos de vetores pGL3 basic e após purificação, podem ser utilizadas em experiências de co-transfecção, na presença de Tat e DNA-PKcs. Estas experiências permitirão perceber se estas mutações individuais afetam os níveis de transcrição basal e mediada por Tat e identificar os locais em específico para Sp1 cruciais para o aumento dos níveis de transativação do LTR do HIV-1, mediada por Tat.

Como o aumento observado nas transfecções com pGL3-LTRSp1 não foi muito elevado, pode-se levantar a questão dos locais de ligação para NF-kB constituírem também elementos *cis* importantes para ação sinérgica de DNA-PKcs com a proteína Tat. Assim, a realização de experiências de mutagénese dirigida, mas desta vez, ao nível dos locais de ligação para NF-kB, poderá revelar a presença de mais intervenientes necessários para a ação de DNA-PKcs como cofator de Tat.

Após a identificação precisa de todos os elementos *cis* do LTR do HIV-1 necessários para a observação do sinergismo entre DNA-PKcs e Tat, poder-se-á estudar a constituição das vias de sinalização importantes, subjacentes a esta atividade. Para além de Sp1, existe uma grande variedade de proteínas que interagem diretamente com Tat, nomeadamente TBP (*TATA-binding protein*), TAK, PKR, T3R, *Tat-binding protein 1*, TAP, *TBP-associated factor* TAF55, HT2A, Tip60, TFIIF e a polimerase de RNA tipo II. Um estudo interessante seria averiguar se estas proteínas interagem com os elementos *cis* e quais os seus níveis de fosforilação, na presença ou ausência de Tat e de DNA-PKcs. Para tal, poder-se-ão fazer ensaios de co-imunoprecipitação (ChIP) com lisados de células 293T, previamente transfectadas com plasmídeos a expressar as diferentes proteínas. Deverão ser utilizados anti-corpos específicos para cada uma das proteínas, que vão permitir a precipitação das que formarem complexos com os elementos *cis*.

Depois da extração e separação das proteínas dos complexos, poder-se-á efetuar um *western blot* de lisados de células 293T, co-transfetadas anteriormente com Tat, DNA-PKcs e cada uma das proteínas, permitindo avaliar os níveis de fosforilação das proteínas que interagiram com os elementos *cis*. Se for observado um aumento dos níveis de fosforilação, pode haver grande probabilidade destas proteínas serem alvo de DNA-PKcs e também fazerem parte do complexo interacional Sp1-Tat-DNA-PKcs. Uma vez que já está provado que interagem com Tat e no sentido de clarificar a ação das proteínas presentes nos complexos, poder-se-á testar se cada uma interage com o fator de transcrição Sp1, através de cromatografia por afinidade. Vários fragmentos de Sp1 deverão ser expressos ligados a proteínas de fusão GST, para estabelecerem ligação com as esferas de glutathione, presentes na matriz da coluna cromatográfica. Experiências de *western blot* deverão ser realizadas no final, para detetar a eluição do fator de transcrição Sp1.

Posteriormente, a realização de experiências de co-localização, através de microscopia confocal com anticorpos conjugados específicos permitirá determinar se cada uma destas proteínas têm a mesma localização, i.e., no núcleo, durante o processo de transcrição viral. Caso esta observação se confirme, poderá constituir mais uma prova da interação destas proteínas com o complexo proteico ternário.

A realização de experiências deste tipo permitirá a identificação de novas vias de sinalização o que é crucial, uma vez que contribuirá para o estudo de novas formas de reativação do genoma viral latente, através do reconhecimento de moléculas que podem ser alvo de drogas já existentes ou que podem vir a ser produzidas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Friedman-Kien, A. E. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J. Am. Acad. Dermatol.* **5**, 468–71 (1981).
2. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–71 (1983).
3. Siegal, F. P. *et al.* Severe Acquired Immunodeficiency in Male Homosexuals, Manifested by Chronic Perianal Ulcerative Herpes Simplex Lesions. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1439–1444 (1981).
4. Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. & Gallo, R. C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497–500 (1984).
5. Shaw, G. M. & Hunter, E. HIV transmission. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
6. Phillips, A. N. *et al.* Serial CD4 lymphocyte counts and development of AIDS. *Lancet (London, England)* **337**, 389–92 (1991).
7. Shafran, S. D. Opportunistic infections in HIV-infected patients. *Can. J. Infect. Dis.* **3**, 82–7 (1992).
8. Mehta, S. *et al.* Kaposi's sarcoma as a presenting manifestation of HIV. *Indian J. Sex. Transm. Dis.* **32**, 108–10 (2011).
9. Whittle, H. *et al.* HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients. *AIDS* **8**, 1617–20 (1994).
10. Jaffar, S. *et al.* Rate of decline of percentage CD4+ cells is faster in HIV-1 than in HIV-2 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **16**, 327–32 (1997).
11. Al-Jabri, A. A. How does HIV-1 infect a susceptible human cell?: Current thinking. *J. Sci. Res. Med. Sci.* **5**, 31–44 (2003).
12. Canki, M. *et al.* Highly productive infection with pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) indicates no intracellular restrictions to HIV-1 replication in primary human astrocytes. *J. Virol.* **75**, 7925–33 (2001).
13. Berger, E. A. *et al.* A new classification for HIV-1. *Nature* **391**, 240–240 (1998).
14. Coakley, E., Petropoulos, C. J. & Whitcomb, J. M. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**, 9–15 (2005).
15. Pirrone, V., Thakkar, N., Jacobson, J. M., Wigdahl, B. & Krebs, F. C. Combinatorial approaches to the prevention and treatment of HIV-1 infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1831–42 (2011).
16. Alexaki, A., Liu, Y. & Wigdahl, B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr. HIV Res.* **6**, 388–400 (2008).
17. Kulkosky, J. & Bray, S. HAART-persistent HIV-1 latent reservoirs: their origin, mechanisms of stability and potential strategies for eradication. *Curr. HIV Res.* **4**, 199–208 (2006).
18. Clotet, B. Strategies for overcoming resistance in HIV-1 infected patients receiving HAART. *AIDS Rev.* **6**, 123–30 (2004).
19. Tilghman, M. W. *et al.* Genetic attributes of blood-derived subtype-C HIV-1 tat and env in India and neurocognitive function. *J. Med. Virol.* **86**, 88–96 (2014).
20. Turner, B. G. & Summers, M. F. Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **285**, 1–32 (1999).
21. Wang, W. K., Chen, M. Y., Chuang, C. Y., Jeang, K. T. & Huang, L. M. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **33**, 131–40 (2000).
22. Massiah, M. A. *et al.* Three-dimensional Structure of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix Protein. *J. Mol. Biol.* **244**, 198–223 (1994).
23. Frankel, A. D. & Young, J. A. T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 1–25 (1998).
24. Bukrinskaya, A. G. HIV-1 assembly and maturation. *Arch. Virol.* **149**, 1067–1082 (2004).
25. Nkeze, J., Li, L., Benko, Z., Li, G. & Zhao, R. Y. Molecular characterization of HIV-1 genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biosci.* **5**, 47 (2015).
26. Karn, J. & Stoltzfus, C. M. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006916 (2012).

27. Jordan, A., Bisgrove, D. & Verdin, E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J.* **22**, 1868–1877 (2003).
28. Berger, E. A., Murphy, P. M. & Farber, J. M. CHEMOKINE RECEPTORS AS HIV-1 CORECEPTORS: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 657–700 (1999).
29. Simon, V., Ho, D. D. & Abdool Karim, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet (London, England)* **368**, 489–504 (2006).
30. Nisole, S. & Saïb, A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* **1**, 9 (2004).
31. Craigie, R. & Bushman, F. D. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006890 (2012).
32. Lusic, M. & Siliciano, R. F. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat. Rev. Microbiol.* (2016). doi:10.1038/nrmicro.2016.162
33. Wu, Y. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology* **1**, 13 (2004).
34. Coiras, M., López-Huertas, M. R., Pérez-Olmeda, M. & Alcamí, J. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 798–812 (2009).
35. Watson, K. & Edwards, R. J. HIV-1-trans-activating (Tat) protein: both a target and a tool in therapeutic approaches. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1521–8 (1999).
36. Pereira, L. A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M. J. & Deacon, N. J. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res.* **28**, 663–8 (2000).
37. Schiralli Lester, G. M. & Henderson, A. J. Mechanisms of HIV Transcriptional Regulation and Their Contribution to Latency. *Mol. Biol. Int.* **2012**, 614120 (2012).
38. Krebs, F. C., Hogan, T. H., Quiterio, S., Gartner, S. & Wigdahl, B. Lentiviral LTR-directed Expression, Sequence Variation, and Disease Pathogenesis.
39. Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Luciw, P. A. & Tjian, R. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* **232**, 755–9 (1986).
40. Proudfoot, N. J., Lee, B. A. & Monks, J. Multiple SP1 binding sites confer enhancer-independent, replication-activated transcription of HIV-1 and globin gene promoters. *New Biol.* **4**, 369–81 (1992).
41. Bianchi, N. *et al.* Targeting of the Sp1 binding sites of HIV-1 long terminal repeat with chromomycin. Disruption of nuclear factor.DNA complexes and inhibition of in vitro transcription. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1489–98 (1996).
42. Hill, R. & Lee, P. W. The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet? *Cell Cycle* **9**, 3460–3469 (2010).
43. Kong, X., Shen, Y., Jiang, N., Fei, X. & Mi, J. Emerging roles of DNA-PK besides DNA repair. *Cell. Signal.* **23**, 1273–1280 (2011).
44. Daniel, R., Katz, R. A. & Skalka, A. M. A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. *Science* **284**, 644–7 (1999).
45. Daniel, R. *et al.* Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. *J. Virol.* **78**, 8573–81 (2004).
46. Baekelandt, V. *et al.* DNA-Dependent protein kinase is not required for efficient lentivirus integration. *J. Virol.* **74**, 11278–85 (2000).
47. Chun, R. F., Semmes, O. J., Neuveut, C. & Jeang, K. T. Modulation of Sp1 phosphorylation by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J. Virol.* **72**, 2615–29 (1998).
48. Tyagi, S., Ochem, A. & Tyagi, M. DNA-dependent protein kinase interacts functionally with the RNA polymerase II complex recruited at the human immunodeficiency virus (HIV) long terminal repeat and plays an important role in HIV gene expression. *J. Gen. Virol.* **92**, 1710–1720 (2011).
49. Rato, S. Cell-host interaction: assessing the role of helper factors in HIV-1 replication. (Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, 2010).
50. Perdigão, P. *et al.* Reactivation of Latent HIV-1 Expression by Engineered TALE

- Transcription Factors. *PLoS One* **11**, e0150037 (2016).
51. J. Sambrook, P. MacCallum, and D. R. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (2001).
52. Gould, S. J. & Subramani, S. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* **175**, 5–13 (1988).
53. Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **89**, 271–7 (1986).
54. Willmore, E. *et al.* A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* **103**, (2004).
55. Ott, M., Geyer, M. & Zhou, Q. The control of HIV transcription: keeping RNA polymerase II on track. *Cell Host Microbe* **10**, 426–35 (2011).
56. Wei, X. *et al.* Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1896–905 (2002).
57. Kimpton, J. & Emerman, M. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J. Virol.* **66**, 2232–9 (1992).
58. Ott, M., Geyer, M. & Zhou, Q. The Control of HIV Transcription: Keeping RNA Polymerase II on Track. *Cell Host Microbe* **10**, 426–435 (2011).
59. Siliciano, R. F. & Greene, W. C. HIV latency. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a007096 (2011).
60. Verdin, E., Paras, P., Van Lint, C. & Lint, C. Van. Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO J.* **12**, 3249–59 (1993).
61. Karn, J. The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**, 4–11 (2011).
62. Gaynor, R. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* **6**, 347–63 (1992).
63. Harrich, D. *et al.* Role of SP1-binding domains in in vivo transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* **63**, 2585–91 (1989).
64. Huang, L. M. & Jeang, K. T. Increased spacing between Sp1 and TATAA renders human immunodeficiency virus type 1 replication defective: implication for Tat function. *J. Virol.* **67**, 6937–44 (1993).
65. Kamine, J. & Chinnadurai, G. Synergistic activation of the human immunodeficiency virus type 1 promoter by the viral Tat protein and cellular transcription factor Sp1. *J. Virol.* **66**, 3932–6 (1992).
66. Zeichner, S. L., Kim, J. Y. & Alwine, J. C. Linker-scanning mutational analysis of the transcriptional activity of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* **65**, 2436–44 (1991).
67. Li, X., Josef, J. & Marasco, W. A. Hiv-1 Tat can substantially enhance the capacity of NIK to induce IkappaB degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 587–94 (2001).
68. Chen, B. K., Feinberg, M. B. & Baltimore, D. The kappaB sites in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat enhance virus replication yet are not absolutely required for viral growth. *J. Virol.* **71**, 5495–504 (1997).
69. Perkins, N. D. *et al.* A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.* **12**, 3551–8 (1993).
70. Zhang, S.-M. *et al.* Interaction between HIV-1 Tat and DNA-PKcs modulates HIV transcription and class switch recombination. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 1138–49 (2014).

7. ANEXOS

Tabela 7.1 Genótipo das estirpes bacterianas.

<i>E. Coli</i> JM109	<i>F' traD36 proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15/Δ(lac-proAB) ginV44 e 14- gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>
<i>E. Coli</i> HST08	<i>F⁻, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ(lacZYA - argF) U169, Δ(mrr - hsdRMS - mcrBC), ΔmcrA, λ⁻</i>

Tabela 7.2 Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR.

Designação do Primer	Sequência 5'-3'
Primer 1 (Forward)	CGACGCGTagggaggtgtggcctgg
Primer 2 (Reverse)	GATCTGCGATCTAAGTAAGCT

Tabela 7.3 Condições do programa de PCR utilizado.

Programa A			
	Etapas	Temperatura	Duração
	Desnaturação inicial	98 °C	30 sec.
30 ciclos	Desnaturação	98 °C	10 sec.
	Annealing	58 °C	30 sec.
	Extensão	72 °C	5,22 sec.
	Extensão Final	72 °C	10 min.

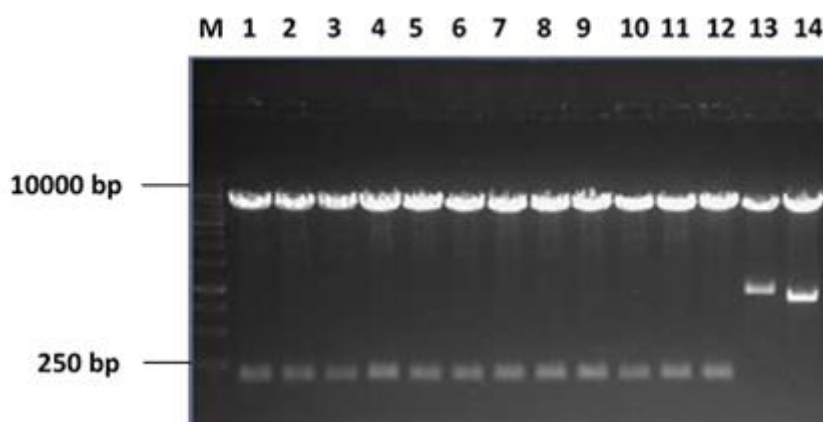


Figura 7.1 *Screening* ou confirmação das ligações vetor-inserto de pGL3-LTRSp1. Após a ligação do inserto (nt -78 a +96) com o vetor pGL3, através de T4 DNA ligase, fez-se a transformação de bactérias Stellar com a ligação. No final, observaram-se 13 clones em placas de petri LB+Amp. A confirmação da presença da ligação nos clones foi efetuada por

eletroforese em gel de agarose, após novo processo de digestão. Observaram-se 12 clones positivos (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 e 12) e um negativo (13). Como controle, utilizou-se o vetor molde selecionado previamente, para diferenciar o inserto pretendido da porção de DNA existente entre os dois locais de corte dos enzimas de restrição, no vetor molde.

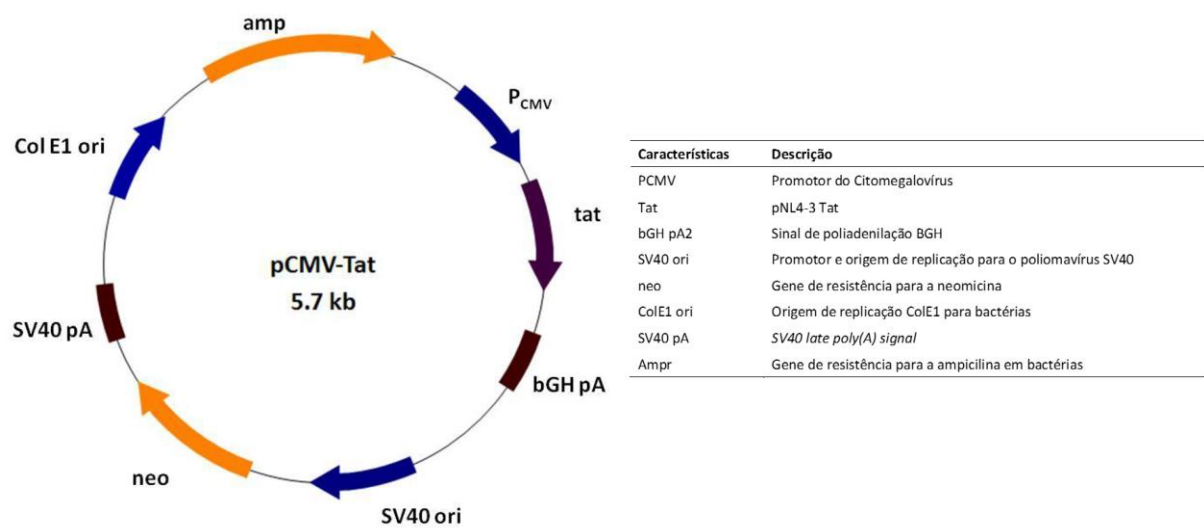


Figura 7.2 Mapa genómico e características do plasmídeo pCMV-Tat.

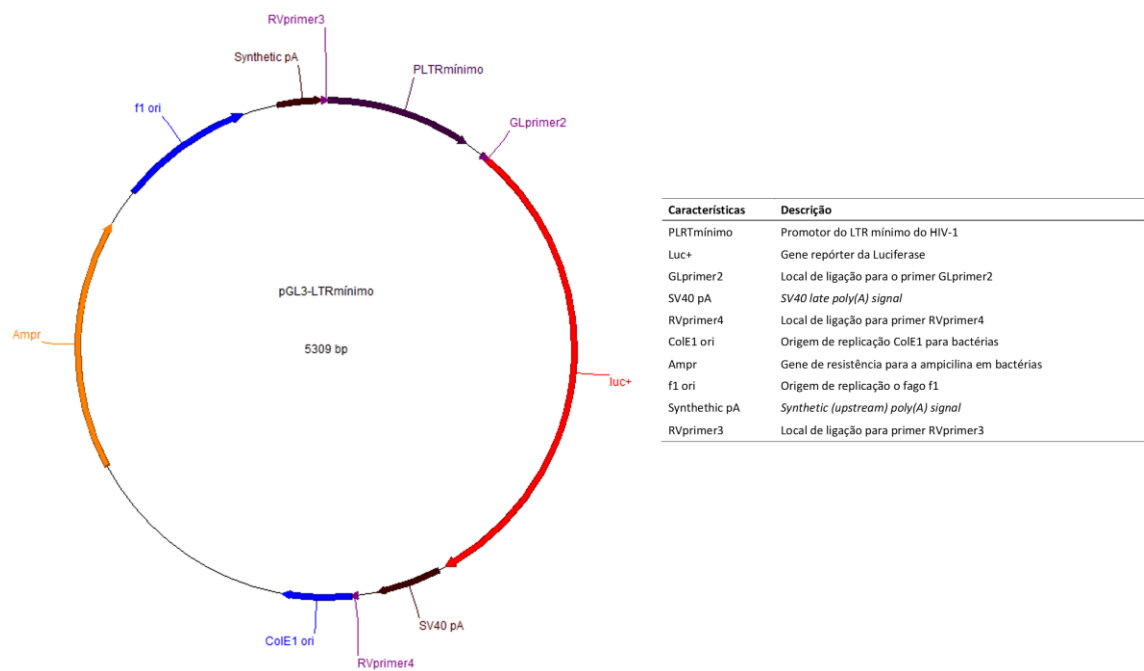


Figura 7.3 Mapa genómico e características do plasmídeo pGL3-LTRmínimo.

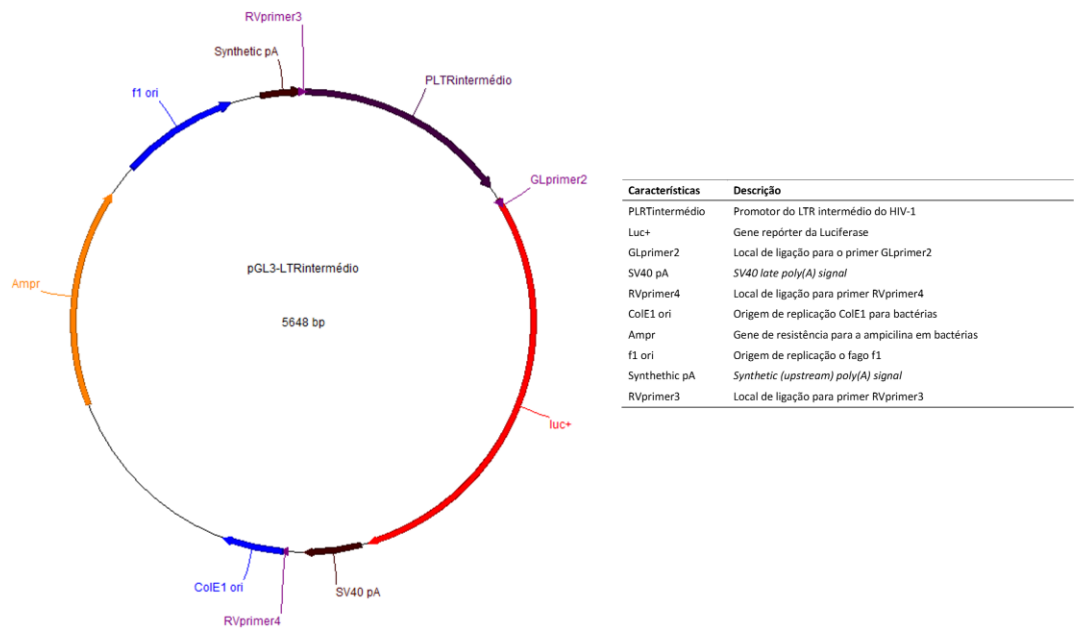


Figura 7.4 Mapa genómico e características do plasmídeo pGL3-LTRintermédio.

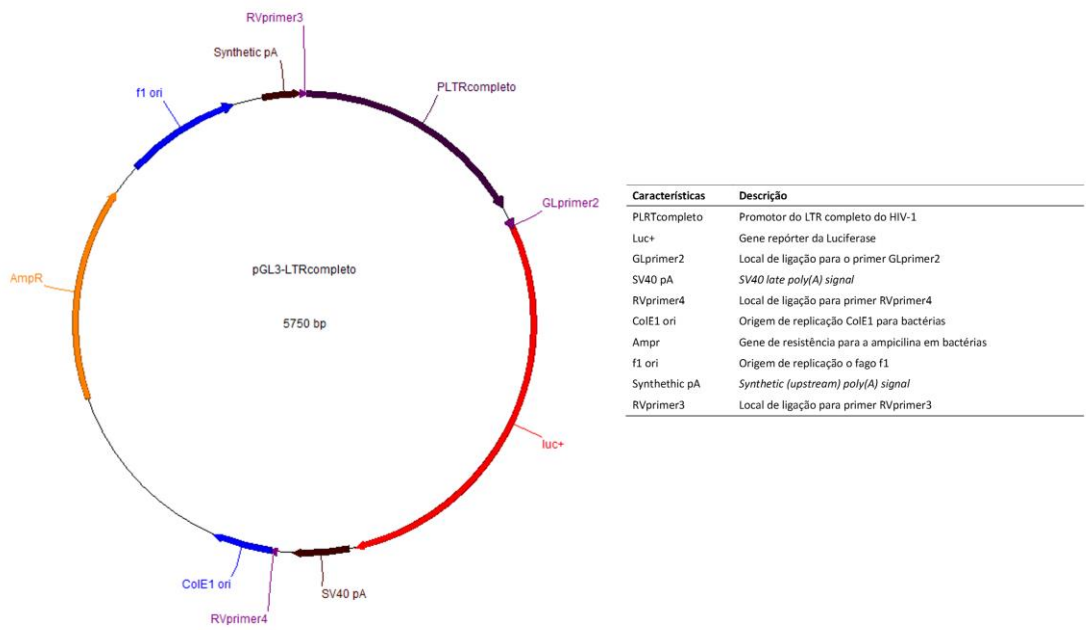


Figura 7.5 Mapa genómico e características do plasmídeo pGL3-LTRcompleto.

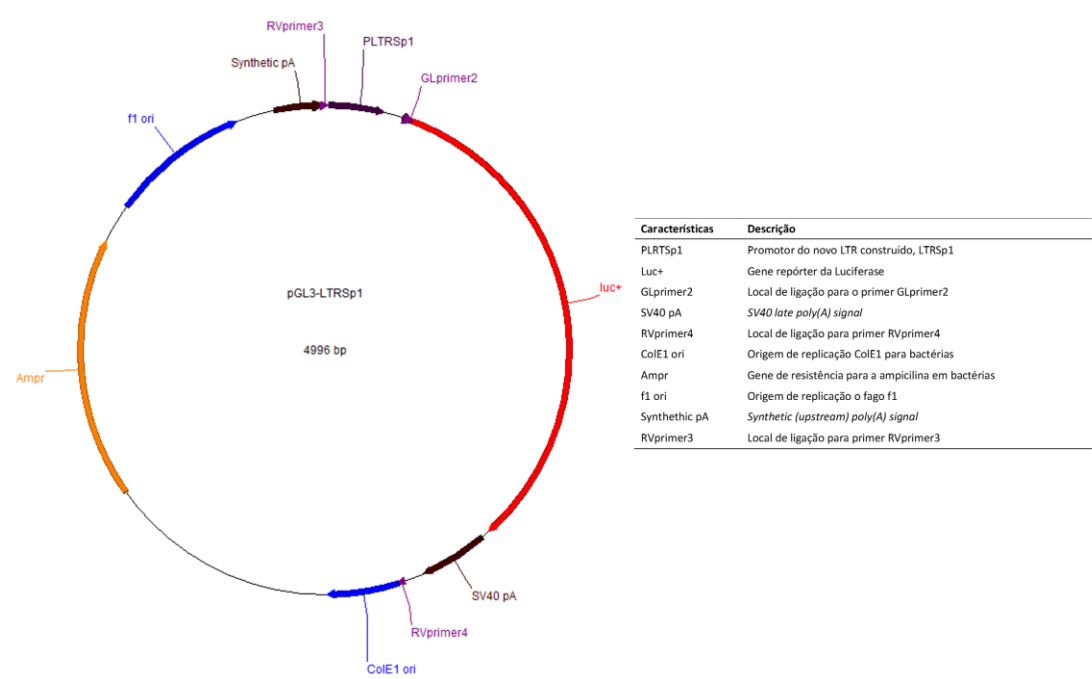


Figura 7.6 Mapa genómico e características do plasmídeo pGL3-LTRSp1.